



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

## TRABAJO FINAL DE GRADO

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio  
Natural

---

### **Microbioma de amebas de vida libre (FLA) presentes en alimentos orgánicos: ¿potencial riesgo para la Salud Pública?**

---

Grado en Biotecnología

Curso académico 2020/2021

Alumna: Sara M<sup>a</sup> Gajas Priego

Tutor: D. Jorge García Hernández

Cotutora: Dña. Yolanda Moreno Trigos



Valencia, Julio 2021

## **Microbiome of free-living amoebae (FLA) present in organic food: potential risk to Public Health?**

### **Abstract:**

There is currently a growing trend to consume organic vegetables, in search of a more sustainable and environmentally friendly way of life. Spain is among the ten largest producers of organic food in the world. However, this type of cultivation may carry an associated risk due to the possible presence of certain organisms, such as free-living amoebae (FLA). These protozoa, can act as reservoirs of microorganisms, some of which may be human pathogens. Conventional microbiological techniques allow the detection of microorganisms, but they are laborious and not very specific. For this reason, the appearance of molecular techniques such as qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) or massive sequencing, has meant a great advance in this field, allowing a large number of samples to be analysed simultaneously.

With reference to the above, the aim of this project was to evaluate the presence of FLA in organic vegetables and to determine their microbiome by targeted sequencing. For the metagenomic analysis, a bioinformatics protocol was developed using the QIIME2 software tool.

A total of 17 representative samples of organic vegetables (spinach and lettuce) were collected between November 2020 and May 2021. The FLA present in the samples were recovered by culture. Their internal DNA was sequenced with the Illumina Miseq platform using a 16S rRNA gene targeted sequencing metagenomics strategy, and sequences were aligned against the SILVA reference database. The pathogenic FLA species *Vermamoeba vermiformis* and *Acanthamoeba castellanii* were identified by qPCR in 13% and 53% of the food samples, respectively. The main genera identified in the microbiome of FLA were *Flavobacterium* (10.65%) and *Pseudomonas* (9.57%). In addition, 52 potentially pathogenic genera were detected, representing 34% of the total abundance. The presence of internalised bacteria of Public Health interest indicates that amoebae are possible vehicles for the transmission of pathogens, offering them protection and promoting their dissemination.

**Key words:** free-living ameboae (FLA); microbiome; organic food; pathogen; metagenomics; food safety

**Author:** Ms. Sara M<sup>a</sup> Gajas Priego

**Academic tutor:** Prof. Mr. Jorge García Hernández

**Co-tutor:** Ms. Yolanda Moreno Trigos

Valencia, July 2021

## **Microbioma de amebas de vida libre (FLA) presentes en alimentos orgánicos: ¿potencial riesgo para la Salud Pública?**

### **Resumen:**

Actualmente existe una tendencia creciente a consumir vegetales orgánicos, buscando un modo de vida más sostenible y a favor del medio ambiente. España se encuentra entre los diez mayores productores de alimentación ecológica a nivel mundial. No obstante, este tipo de cultivos puede conllevar un riesgo asociado debido a la posible presencia de ciertos organismos como las amebas de vida libre (FLA). Estos protozoos pueden actuar como reservorios de microorganismos, pudiendo ser algunos de estos, patógenos humanos. Las técnicas microbiológicas convencionales permiten la detección de microorganismos, pero resultan laboriosas y poco específicas. Es por ello, que la aparición de técnicas moleculares como la qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) o la secuenciación masiva ha supuesto un gran avance en este campo, permitiendo analizar un gran número de muestras simultáneamente.

En referencia a lo previamente expuesto, en el presente proyecto se quiso evaluar la presencia de FLA en vegetales ecológicos y determinar el microbioma de las mismas mediante secuenciación dirigida. Para el análisis por metagenómica, se puso a punto un protocolo bioinformático utilizando la herramienta informática QIIME2.

Un total de 17 muestras representativas de vegetales orgánicos (espinacas y lechugas) fueron recolectadas entre Noviembre de 2020 y Mayo de 2021. Las FLA presentes en las muestras fueron recuperadas por cultivo. El DNA interior de las mismas fue secuenciado con la plataforma Illumina Miseq mediante una estrategia de metagenómica de secuenciación dirigida al gen 16S rRNA y las secuencias fueron alineadas contra la base de datos de referencia SILVA. Las especies patógenas de FLA, *Vermamoeba vermiformis* y *Acanthamoeba castellanii* fueron identificadas mediante qPCR en un 13% y 53% de las muestras de alimentos, respectivamente. Los principales géneros identificados en el microbioma de las FLA, fueron *Flavobacterium* (10.65%) y *Pseudomonas* (9.57%). Además, se detectaron 52 géneros potencialmente patógenos, representando el 34% de la abundancia total. La presencia de bacterias internalizadas de interés para la Salud Pública, indica que las amebas son posibles vehículos de transmisión de patógenos, ofreciéndoles protección y favoreciendo su diseminación.

**Palabras clave:** amebas de vida libre (FLA); microbioma; alimentos orgánicos; patógenos; metagenómica; seguridad alimentaria

**Alumna:** Dña. Sara Mª Gajas Priego

**Tutor:** D. Jorge García Hernández

**Cotutora:** Dña. Yolanda Moreno Trigos

Valencia, Julio 2021

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas que han hecho posible este trabajo. En especial a Jorge, por ofrecerme realizar este proyecto, y a Yolanda, por darme autonomía en el laboratorio, guiarme durante esta etapa y confiar en mí desde el primer momento. Gracias también a José Luis e Inma, por acogerme como una más en vuestro equipo.

Gracias Maite, por darme ánimos desde el primer hasta el último minuto de esta experiencia, y gracias, Lara, por enseñarme y ayudarme.

Gracias sobre todo a mi familia, por el apoyo incondicional en todo momento y por transmitirme vuestro entusiasmo, os dedico este trabajo.

# Índice de contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Agricultura ecológica .....	1
1.1.1. Alimentación orgánica en España .....	1
1.1.2. Calidad y seguridad en alimentos ecológicos.....	2
1.1.3. Riesgos microbiológicos de los alimentos vegetales .....	2
1.2. Amebas de vida libre (FLA).....	3
1.2.1. Ciclos de vida .....	3
1.2.2. Hábitat .....	3
1.2.3. Relación FLA-bacterias.....	4
1.2.4. Vida intracelular de las bacterias internalizadas.....	5
1.2.5. Las amebas como “Caballos de Troya”.....	7
1.3. Métodos moleculares para la detección e identificación de microorganismos.....	7
1.3.1. Identificación de FLA mediante qPCR.....	8
1.3.2. Metagenómica de secuenciación dirigida.....	8
1.3.2.1. Gen 16S.....	8
1.3.2.2. Tratamiento de Cloro y PMA .....	9
1.3.2.3. Secuenciación Illumina.....	10
1.3.3. Análisis bioinformático. QIIME2 .....	10
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1. Origen de las muestras de alimentos.....	12
3.2. Preparación de las muestras.....	12
3.3. Aislamiento de FLA y visualización .....	12
3.4. Bloqueo de DNA bacteriano no internalizado. Tratamiento con PMA ....	13
3.5. Extracción de DNA y secuenciación .....	13
3.6. Detección de FLA mediante qPCR .....	14
3.7. Metagenómica 16S rRNA .....	15
3.8. Análisis de la comunidad microbiana .....	16
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
4.1. Procesado de muestras .....	18
4.2. Cultivo de FLA.....	18
4.3. Identificación de FLA patógenas.....	19
4.4. Microbioma bacteriano de las FLA.....	21
4.5. Identificación de patógenos .....	26

<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>38</b>
Anexo 1: Medio de cultivo sólido.....	38
Anexo 2: Reactivos empleados en tratamiento de Cloro y PMA.....	38
Anexo 3: <i>Pipeline</i> de QIIME2 .....	39
Anexo 4: Tabla suplementaria del análisis bioinformático.....	42

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Evolución del consumo interior de alimentos ecológicos en España desde 2003 a 2015. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2018 .....	1
<b>Figura 2.</b> Representación de la diferenciación a quiste o trofozoito en función de las condiciones ambientales. Siddiqui <i>et al.</i> , 2021 .....	2
<b>Figura 3.</b> (A) <i>C. jejuni</i> dentro de las vacuolas de <i>Acanthamoeba castellanii</i> . (Bui <i>et al.</i> , 2012). (B) <i>L. monocytogenes</i> en <i>Acanthamoeba polyphaga</i> . (Doyscher <i>et al.</i> , 2013). (C) <i>Salmonella</i> internalizada por <i>Dictyostelium discoideum</i> (Valenzuela <i>et al.</i> , 2020). (D) <i>E. coli</i> O157 en <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (Barker <i>et al.</i> , 1999). Las flechas señalan a las bacterias.....	5
<b>Figura 4. Diferentes mecanismos de supervivencia post ingestión de bacterias en amebas de vida libre.</b> (A) Supervivencia de célula bacteriana en una FLA. (B) Supervivencia y multiplicación de bacterias en una FLA. (C) Multiplicación y liberación de bacterias tras la lisis de la FLA. Adaptado de Vaerewijck <i>et al.</i> , 2014. ....	6
<b>Figura 5. Esquema del complejo ribosómico y del gen 16S rRNA.</b> Los recuadros blancos y grises indican las regiones conservadas y las regiones hipervariables (V1-V9), respectivamente. Las flechas en negrita muestran las posiciones aproximadas de los cebadores universales en la secuencia del gen 16S rRNA de <i>Escherichia coli</i> . Fukuda <i>et al.</i> , 2016.....	9
<b>Figura 6. Tratamiento con PMA.</b> La membrana es impermeable al PMA, haciéndolo específico de células muertas. En el interior de la célula muerta, se une al DNA y la exposición a una luz visible intensa hace que se adhiera a este de forma covalente. Esta modificación del DNA evita la amplificación en reacciones de PCR posteriores. BIOTIUM, 2019.....	99
<b>Figura 7.</b> Esquema de trabajo seguido durante el estudio .....	17
<b>Figura 8. Fotografías en microscopio de contraste de fases (40x).</b> (A, B) FLA aisladas de muestras de lechuga. (C, D) FLA aisladas de muestras de espinaca. Las flechas señalan las amebas de vida libre. (E, F, G, H) Alta densidad de FLA .....	19
<b>Figura 9.</b> Fotografía en microscopio de contraste de fases (100X) de una <i>Vannella</i> (izquierda) y <i>Acanthamoeba</i> (derecha) en muestras de vegetales ecológicos .....	19
<b>Figura 10.</b> Curva de amplificación de qPCR de <i>A. castellanii</i> (izquierda) y <i>V. vermiformis</i> (derecha). ....	20

<b>Figura 11.</b> Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras.....	<b>21</b>
<b>Figura 12.</b> Distribución de los filos más abundantes de las muestras de espinaca (izquierda) y lechuga (derecha).....	<b>22</b>
<b>Figura 13.</b> Distribución de las clases más abundantes del promedio de las muestras de vegetales ecológicos .....	<b>22</b>
<b>Figura 14.</b> Distribución de las clases más abundantes del promedio de muestras de espinaca (izquierda) y lechuga (derecha).....	<b>23</b>
<b>Figura 15.</b> Distribución de los géneros más abundantes del promedio de muestras de espinaca (izquierda) y lechuga (derecha).....	<b>24</b>
<b>Figura 16.</b> Análisis de componentes principales. Leyenda (tipo de alimento): rojo = espinaca, azul = lechuga.....	<b>25</b>
<b>Figura 17.</b> Curvas de rarefacción para todas las muestras representando el índice de diversidad alfa <i>Observed-features</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 18.</b> Análisis de componentes principales. Leyenda (estación del año): naranja = otoño, verde = invierno, morado = primavera.....	<b>26</b>



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Especies de FLA detectadas en vegetales. Adaptado de Vaerewijck <i>et al.</i> , 2014 .....	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b> Interacciones entre las FLA y otros microorganismos evidenciadas en condiciones ambientales. Adaptado de Samba-Louaka <i>et al.</i> , 2019.....	<b>5</b>
<b>Tabla 3.</b> Muestras procesadas y nomenclatura correspondiente.....	<b>12</b>
<b>Tabla 4.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados en la secuenciación de las muestras. Takahashi <i>et al.</i> , 2014 .....	<b>14</b>
<b>Tabla 5.</b> Secuencias nucleotídicas de los iniciadores y de la sonda TaqMan de <i>A. castellanii</i> .....	<b>14</b>
<b>Tabla 6.</b> Secuencias nucleotídicas de los iniciadores de <i>V. vermiformis</i> . .....	<b>14</b>
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de qPCR para la identificación de <i>A. castellanii</i> . Qvarnstrom <i>et al.</i> , 2006.....	<b>15</b>
<b>Tabla 8.</b> Condiciones de qPCR para la identificación de <i>V. vermiformis</i> . Kuiper <i>et al.</i> , 2006.....	<b>15</b>
<b>Tabla 9.</b> Resultado de la presencia de FLA patógenas por qPCR.....	<b>20</b>
<b>Tabla 10.</b> Géneros más abundantes en el promedio de las muestras previamente no identificados .....	<b>24</b>
<b>Tabla 11.</b> Bacterias de interés para la Salud Pública más abundantes presentes en las muestras de vegetales orgánicos .....	<b>27</b>
<b>Tabla 12.</b> Abundancia relativa de especies patógenas bacterianas identificadas mediante BLAST .....	<b>29</b>
<b>Tabla 13.</b> Abundancia relativa de bacterias de interés para la Salud Pública presentes en las muestras de vegetales orgánicos.....	<b>42</b>

## Índice de abreviaturas

**A:** Adenina

**ASV:** Variante de secuencia de amplicón (Amplicon Sequence Variant)

**ARB:** Bacterias resistentes a las amebas (Amoeba-Resistant Bacteria)

**C:** Citosina

**CDC:** Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

**EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)

**FLA:** Amebas de vida libre (Free-Living Amoebae)

**G:** Guanina

**g:** Gramo

**l:** Litro

**mg:** Miligramo

**ml:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**NGS:** Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing)

**NNA:** Agar no nutritivo (Non-Nutrient Agar)

**NNAP:** Agar no nutritivo con solución Page (Non-Nutrient Agar Page)

**PAS:** Solución salina amebica de Page (Page's Amoeba Saline)

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

**PCA:** Análisis de componentes principales

**PMA:** Propidio de monoazida (Propidium Monoazide)

**ppm:** Partes por millón

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

**RNA:** Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosómico (Ribosomal Ribonucleic Acid)

**rpm:** Revoluciones por minuto

**UE:** Unión Europea

**T:** Timina

**WGS:** Secuenciación de genomas completos (Whole Genome Sequencing)

**μl:** Microlitro

**°C:** Grados Celsius

**%:** Tanto por ciento

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Agricultura ecológica

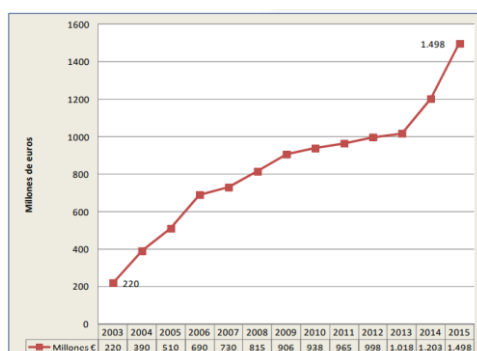
¿Qué se entiende por agricultura orgánica o ecológica? La Comisión Europea la define como “un método de producción cuyo objetivo es obtener alimentos utilizando sustancias y procesos naturales”. Este tipo de agricultura tiende a tener un impacto ambiental limitado, dado que fomenta el uso responsable de la energía y recursos naturales, el mantenimiento de la biodiversidad, la preservación de los equilibrios ecológicos regionales, la mejora de la fertilidad del suelo y el mantenimiento de la calidad del agua (COMISIÓN EUROPEA, 2021). Por otro lado, con agricultura convencional se entiende el tipo predominante de agricultura intensiva en la Unión Europea (UE), la cual emplea un alto uso de fertilizantes minerales, así como antibióticos o pesticidas sintéticos (EUROPEAN PARLIAMENT, 2016).

Actualmente, existe un interés creciente en la producción agrícola orgánica en todo el mundo, en busca de la sostenibilidad y la mejora de la Salud Pública. Además, el interés por los alimentos orgánicos ha crecido notablemente a medida que los consumidores reaccionan a los efectos de los pesticidas en la salud y el medio ambiente, y la seguridad alimentaria (Hughner *et al.*, 2007).

### 1.1.1. Alimentación orgánica en España

En Europa, la superficie dedicada a la agricultura ecológica ha aumentado casi un 66% en los últimos diez años, pasando de 8.3 millones de hectáreas en 2009 a 13.8 millones de hectáreas en 2019 (COMISIÓN EUROPEA, 2021). La producción ecológica de nuestro país también ha experimentado un espectacular crecimiento en la última década, ocupando a fecha de 2016, el quinto lugar en el ranking mundial por superficie en producción ecológica, y posicionando en 2018 a España como primer productor de la Unión Europea (ECOLOGICAL, 2018). Actualmente, España ocupa la décima posición en el mercado mundial de los productos ecológicos (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2020).

En cuanto al consumo interno, alcanzando una cifra aproximada a 1500 millones de euros en 2015, este ha experimentado una evolución positiva que se ha incrementado notablemente durante los últimos años (Figura 1). Se espera, además, que esta tendencia siga manteniéndose en un futuro, dada la importante industria alimentaria del país y las idóneas condiciones naturales que provee (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2018).



**Figura 1.** Evolución del consumo interior de alimentos ecológicos en España desde 2003 a 2015. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2018.

### 1.1.2. Calidad y seguridad en alimentos ecológicos

Según la Estrategia Alimentaria de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) 2020, nos enfrentamos a la aparición de nuevos peligros alimentarios. Los cambios demográficos como el crecimiento y envejecimiento de la población, y los consumidores, impulsados por principios de sostenibilidad y estilos de vida saludable, conducen a una mayor diversificación de las dietas en Europa y plantean retos para la inocuidad y seguridad alimentaria (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2020). Además, se espera que sigan emergiendo nuevos riesgos en la producción de alimentos, lo que implica un aumento en la necesidad de metodologías, datos, experiencia y asesoramiento científico sobre las nuevas cuestiones de seguridad alimentaria (EUROPEAN PARLIAMENT, 2016).

Se debe tener en cuenta que existe una brecha de conocimiento sobre algunos aspectos de la calidad microbiológica y seguridad de los alimentos orgánicos (EUROPEAN PARLIAMENT, 2016). El principal riesgo del consumo de alimentos ecológicos reside en la contaminación bacteriana. No obstante, dado que los consumidores de alimentos orgánicos tienden a tener un estilo de vida más saludable en general, no se ha asumido que un alimento ecológico presenta en realidad riesgos microbiológicos similares a los alimentos que son consumidos habitualmente, y que deben ser manipulados en condiciones adecuadas que eviten la aparición de enfermedades transmitidas por los alimentos (Mie *et al.*, 2017).

### 1.1.3. Riesgos microbiológicos de los alimentos vegetales

Al igual que en el resto del mundo, en España, el sector de producción primaria ecológica más desarrollado es el de productos de origen vegetal. De la misma forma, las frutas y vegetales son los alimentos ecológicos más consumidos (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, 2020). Las verduras que se consumen crudas son vehículos potenciales para la transmisión de cualquier tipo de patógeno capaz de causar enfermedades humanas (Lynch *et al.*, 2009).

Algunas de las fuentes establecidas de contaminación microbiológica de los vegetales frescos incluyen el suelo, el ganado y fauna silvestre, siendo el uso de abono y fertilizantes naturales, así como el agua de riego, los principales factores de riesgo (Alegbeleye *et al.*, 2018).

El agua de riego ha sido identificada como un importante reservorio y potencial vehículo de patógenos transmitidos por los alimentos, dado que pueden permanecer en esta de forma viable y sobrevivir durante varios meses. Se ha demostrado la relación entre algunos parásitos como protozoos pertenecientes a los géneros *Cryptosporidium* y *Giardia* presentes en el agua y la contaminación de vegetales (Amorós *et al.*, 2010).

Los protozoos de vida libre, como las FLA, son omnipresentes en los ecosistemas naturales como depredadores bacterianos. Sin embargo, aunque algunas especies también pueden actuar como huéspedes de bacterias patógenas que pueden causar una amenaza para la Salud Pública, hay poca información sobre su presencia en vegetales. Estas no suelen incluirse en la vigilancia microbiológica, ya que tienden a considerarse microorganismos inofensivos. En consecuencia, los datos sobre FLA en alimentos siguen siendo escasos y hasta el momento solo hay un trabajo publicado en el que se determinó la presencia de FLA en lechugas, confirmando que eran portadoras de patógenos humanos mediante el análisis del microbioma de las mismas (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 a).

## 1.2. Amebas de vida libre (FLA)

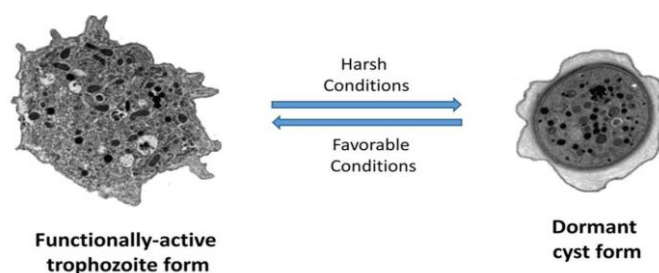
Las amebas de vida libre (FLA) son un grupo heterogéneo de protozoos ubicuos. Son organismos de vida libre porque a pesar de poder invadir a un hospedador y vivir como parásitos de éste, tienen la capacidad de existir en la naturaleza como organismos libres. El término “ameba” deriva de la palabra griega amoibé, que significa cambiante, haciendo referencia precisamente a su aspecto cambiante al moverse (Page, 1988). Algunas amebas de vida libre pueden ser patógenas, entre las que se encuentran *Acanthamoeba castellanii* o *Vermamoeba vermiformis*, causantes de queratitis, una infección progresiva de la córnea (Hajjalilo *et al.*, 2015).

### 1.2.1. Ciclos de vida

Las FLA presentan al menos dos estados de desarrollo: el trofozoito, la forma de crecimiento activo mediante la cual son capaces de moverse, alimentarse y replicarse por fisión binaria, y el quiste, la forma de latencia metabólicamente inactiva. Presentan la forma de trofozoito en condiciones favorables, pero son capaces de cambiar a la forma de quiste latente bajo condiciones adversas (Figura 2) (Vaerewijck *et al.*, 2014).

La formación del quiste, o enquistamiento, supone un cambio fundamental en el trofozoito, tanto en su morfología como fisiología, y su principal función en el ciclo de vida de las amebas suele ser la de protección frente a condiciones ambientales desfavorables. Esta conversión requiere cambios a nivel molecular y celular como la reducción del contenido citoplasmático, RNA, DNA o proteínas, la expulsión de materiales no esenciales y la formación de una membrana muy resistente alrededor del organismo, permitiendo la supervivencia en un estado viable durante muchos años (Siddiqui *et al.*, 2021).

Del mismo modo, las condiciones favorables pueden provocar el desenquistamiento, es decir, el paso de quiste a trofozoito. Estos últimos se reconocen porque presentan pseudópodos que se proyectan hacia el exterior de la superficie celular.



**Figura 2.** Representación de la diferenciación a quiste o trofozoito en función de las condiciones ambientales. Siddiqui *et al.*, 2021.

### 1.2.2. Hábitat

Las FLA abundan especialmente en suelos, donde regulan junto a los flagelados heterótrofos la abundancia bacteriana (Esteban, 2015). Sin embargo, son organismos ubicuos que han sido aislados en el medio ambiente a partir del agua, tierra y aire,

además de otros entornos como aires acondicionados, lentillas y estuches para guardarlas (Vaerewijck *et al.*, 2014).

En el sector alimentario, las FLA han sido detectadas y recuperadas a partir de distintas superficies que se encontraban en contacto con la carne, como cintas transportadoras, las agujas de un ablandador de carne, y mesas de trabajo (Vaerewijck *et al.*, 2008); en caparazones o branquias de crustáceos (Fernandez-Leborans, 2010), así como en frigoríficos domésticos, especialmente en las bandejas de verduras, indicando que las FLA están presentes en los vegetales y pueden transferirse a las superficies (Vaerewijck *et al.*, 2010). Se han llevado a cabo estudios donde se ha logrado aislar amebas de una gran variedad de vegetales como zanahoria, cebolla, coliflor, lechuga, rábano, espinaca y tomate, recogidos en la Tabla 1 (Vaerewijck *et al.*, 2014).

**Tabla 1.** Especies de FLA detectadas en vegetales. Adaptado de Vaerewijck *et al.*, 2014.

Vegetales	Especies identificadas	Referencia
Lechugas, cebolletas, rábanos	<i>A. rhysodes</i> , <i>A. palestinesis</i> , <i>Naegleria gruberi</i>	Ciurea-Van Saanen, 1981
Champiñones	<i>Acanthamoeba</i> spp., <i>Hartmannella</i> spp., <i>Vannella</i> spp.	Napolitano, 1982
Lechuga de hoja de roble, lechuga Boston	<i>Acanthamoeba</i> spp., <i>Hartmannella</i> spp.	Napolitano & Colletti- Eggolt, 1984
Zanahorias, rábanos, tomates, champiñones, coliflores, espinacas	<i>A. polyphaga</i> , <i>A. rhysodes</i> , <i>A.</i> <i>castellanii</i>	Rude et al., 1984
Zanahorias	<i>A. culbertsoni</i> , <i>A. rhysodes</i> , <i>H.</i> <i>vermiformis</i>	Sharma et al, 2004
Lechuga romana	<i>A. palestinesis</i>	Gourabathini et al., 2008
Lechuga mantecosa	<i>Cochliopodium</i> sp., <i>Mayorella</i> <i>vespertiloides</i> , <i>Ripella platyopodia</i> , <i>Ripella platyopodia</i> , <i>Vannella</i> <i>simplex</i> , <i>H. vermiformis</i> , <i>Saccamoeba</i> sp., <i>Vahlkampfia</i> sp.	Vaerewijck et al., 2011

Un estudio realizado por Vaerewijck *et al.* (2011), demostró que el enjuague de hojas de lechuga seguido de una centrifugación doméstica manual no consiguió eliminar la presencia de FLA, sino tan sólo reducir su número. También, consiguieron aislar protozoos a partir de lechuga lista para el consumo, sugiriendo que estos son capaces de sobrevivir a tratamientos como el lavado industrial.

### 1.2.3. Relación FLA-bacterias

La asociación de las FLA con distintas especies bacterianas es un hecho común. Ya en 1967 se observó bajo el microscopio la presencia de endosimbiontes citoplasmáticos en *A. castellanii* (Jeon & Lorch, 1967).

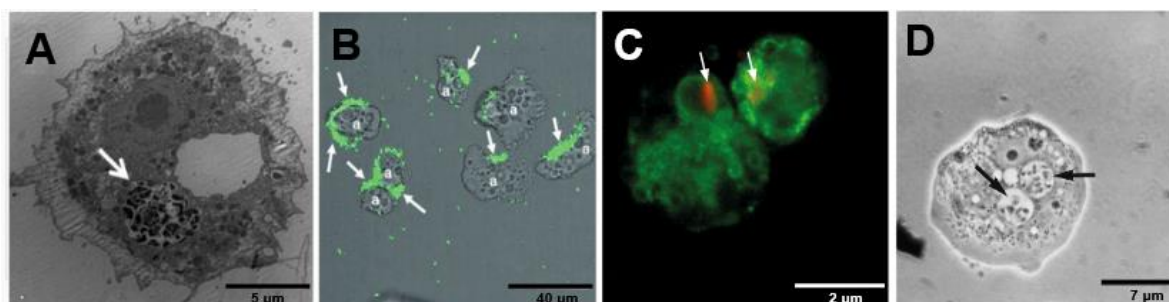
El alcance de las asociaciones que se han evidenciado en condiciones naturales entre microorganismos y FLA incluye numerosas bacterias (Tabla 2). La mayoría de los

estudios de interacción bacteria-FLA se realizan con miembros del género *Acanthamoeba* (Vaerewijck *et al.*, 2014).

**Tabla 2.** Interacciones entre las FLA y otros microorganismos evidenciadas en condiciones ambientales. Adaptado de Samba-Louaka *et al.*, 2019.

Microorganism	FLA host	Reference
<b>Bacteria</b>		
<b>Alphaproteobacteria</b>		
<i>Caedibacter</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Horn <i>et al.</i> 1999)
<i>Jidaibacter</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Fritsche <i>et al.</i> 1999; Schulz <i>et al.</i> 2015a)
<i>Nucleicultrix</i>	<i>Vermamoeba</i>	(Schulz <i>et al.</i> 2014)
<i>Odysella</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Birtles <i>et al.</i> 2000)
<i>Paracaedibacter</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Horn <i>et al.</i> 1999)
<b>Betaproteobacteria</b>		
<i>Procabacter</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Horn <i>et al.</i> 2002; Schmitz-Esser <i>et al.</i> 2008)
<b>Gammaproteobacteria</b>		
<i>Berkiella</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Mehari <i>et al.</i> 2016)
<i>Cochliophilus</i>	<i>Cochliopodium</i>	(Tsao <i>et al.</i> 2017)
<i>Legionella</i>	Multiple FLA hosts	(Rowbotham 1980)
<i>Occultobacter</i>	<i>Vannella</i>	(Schulz <i>et al.</i> 2015b)
<i>Nucleophilum</i>	<i>Amoebozoa</i> sp. JAMX8	(Schulz <i>et al.</i> 2015b)
<i>Pseudomonas</i>	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Echinamoeba</i>	(Michel <i>et al.</i> 1995)
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i>	(Corsaro <i>et al.</i> 2013a)
<b>Deltaproteobacteria</b>		
<i>Helicobacter</i>	Uncharacterized FLA	(Moreno-Mesonero <i>et al.</i> 2017)
<i>Syntrophorhabdus</i>	<i>Pelomyxa</i>	(Gutiérrez <i>et al.</i> 2017)
<b>Bacteroidetes</b>		
<i>Flavobacterium</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Horn <i>et al.</i> 2001; Müller, Schmid and Michel 1999)
<i>Amoebophilus</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Horn <i>et al.</i> 2001)
<b>Actinobacteria</b>		
<i>Mycobacterium</i>	Multiple FLA hosts	(Drancourt 2014; Thomas and McDonnell 2007)
<i>Rhodococcus</i>	<i>Pelomyxa</i>	(Gutiérrez <i>et al.</i> 2017)
<b>Chlamydiae</b>		
<i>Neochlamydia</i>	<i>Vermamoeba</i> , <i>Acanthamoeba</i>	(Horn <i>et al.</i> 2000; Ishida <i>et al.</i> 2014)
<i>Mesochlamydia</i>	<i>Vannella</i>	(Corsaro <i>et al.</i> 2013b)
<i>Parachlamydia</i>	<i>Acanthamoeba</i>	(Amann <i>et al.</i> 1997)

Además, anteriores estudios han demostrado la existencia de una asociación entre FLA y los principales microorganismos patógenos transmitidos a través de los alimentos: *C. jejuni*. (Bui *et al.*, 2012)., *L. pneumophila* (Moreno *et al.*, 2019), *Salmonella* spp. (Valenzuela *et al.*, 2020), *E. coli* O157:H7 (Barker *et al.*, 1999) y *L. monocytogenes* (Doyscher *et al.*, 2013) (Figura 3).



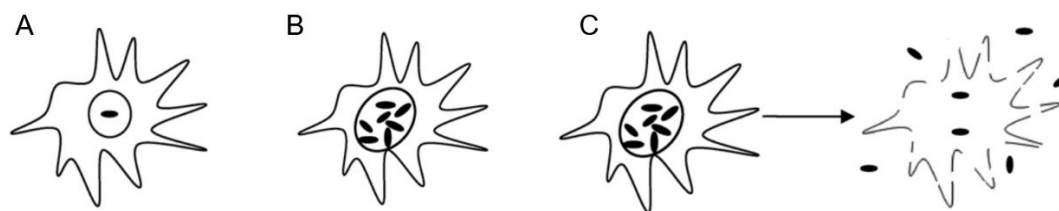
**Figura 3.** (A) *C. jejuni* dentro de las vacuolas de *Acanthamoeba castellanii*. (Bui *et al.*, 2012). (B) *L. monocytogenes* en *Acanthamoeba polyphaga*. (Doyscher *et al.*, 2013). (C) *Salmonella* internalizada por *Dictyostelium discoideum* (Valenzuela *et al.*, 2020). (D) *E. coli* O157 en *Acanthamoeba polyphaga* (Barker *et al.*, 1999). Las flechas señalan a las bacterias.

#### 1.2.4. Vida intracelular de las bacterias internalizadas

Las FLA se alimentan principalmente por fagocitosis de bacterias y su digestión se produce dentro de los fagolisosomas, beneficiando a la ameba para sus necesidades nutricionales (Delafont *et al.*, 2013). El destino de los microorganismos internalizados depende de la virulencia bacteriana y de la susceptibilidad del huésped ameboide. Tras



su internalización, las bacterias permanecen en el fagosoma o escapan de él. Aquellas que no son digeridas pueden tener tres destinos distintos: sobrevivir en el interior de la FLA sin multiplicarse, así como dividirse, pudiendo causar o no la lisis de la ameba (Figura 4) (Vaerewijck *et al.*, 2014).



**Figura 4. Diferentes mecanismos de supervivencia post ingestión de bacterias en amebas de vida libre.** (A) Supervivencia de célula bacteriana en una FLA. (B) Supervivencia y multiplicación de bacterias en una FLA. (C) Multiplicación y liberación de bacterias tras la lisis de la FLA. Adaptado de Vaerewijck *et al.*, 2014.

Por tanto, a pesar del papel de las FLA como depredadores de bacterias, se ha demostrado que varios tipos de microorganismos son resistentes a la degradación de las amebas y son capaces de sobrevivir en su interior. Además, aquellas bacterias que también pueden multiplicarse se denominan ARB, por sus siglas en inglés de bacterias resistentes a las amebas (Samba-Louaka *et al.*, 2019). Se ha afirmado con anterioridad, que las ARB incluyen bacterias patógenas para el ser humano como *Legionella pneumophila*. De hecho, se ha propuesto que, debido a la capacidad que estas presentan para resistir la digestión por las FLA, podrían también resistir la digestión por los macrófagos (Greub & Raoult, 2004).

A pesar de que una amplia gama de artículos describe las interacciones FLA-ARB, muy pocos estudian el microbioma bacteriano completo de las amebas de vida libre. Hasta ahora, tan sólo tres estudios han abordado este tema mediante tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS), a partir de FLA aisladas de fuentes de agua potable (Delafont *et al.*, 2013), de vegetales (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 a) y de aguas residuales (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 b). Por ello, para poder establecer qué bacterias tienden a interactuar con las FLA y descubrir nuevas posibles ARB, sería necesario realizar más investigaciones sobre el microbioma bacteriano de las amebas de vida libre.

Además, desde el punto de vista de la Salud Pública, la permanencia transitoria de bacterias patógenas en las FLA es preocupante por una serie de motivos. En primer lugar, estas actúan como huéspedes de bacterias patógenas transmitidas por alimentos como *Campylobacter jejuni*, o *Listeria monocytogenes*, a las cuales ofrecen protección, asegurando su supervivencia (Vaerewijck *et al.*, 2014).

Por otra parte, algunos microorganismos internalizados por las FLA son capaces de desarrollar vías de escape y logran superar los mecanismos de digestión celular. De hecho, se observó como *Legionella pneumophila* desarrolló un mecanismo de escape para evitar ser digerida por las amebas y aplica diversos pasos de este mecanismo en los macrófagos alveolares humanos, lo que sugiere que las FLA pueden servir como "gimnasios biológicos" (Buse & Ashbolt, 2011). En algunos casos, también pueden actuar como vehículos de transmisión y permitir a las bacterias superar la primera línea de defensa humana, facilitando su crecimiento, dispersión y capacidad para causar infecciones. Por esto, deberían ser consideradas un riesgo para la salud humana (Vaerewijck *et al.*, 2014).

### 1.2.5. Las amebas como “Caballos de Troya”

El aislamiento de patógenos transmitidos por los alimentos, directamente de las FLA, apoya la hipótesis de que estas pueden actuar como reservorio de este tipo de bacterias (Vaerewijck *et al.*, 2014). Ya en 1994, se planteó el hecho de que las amebas de vida libre pudieran actuar como “Caballos de Troya”, protegiendo a las bacterias y pudiendo ser un vehículo de transmisión para las mismas (Barker y Brown, 1994).

En estudios anteriores, Rowbotham (1980) propuso la hipótesis de que *L. pneumophila* podría ser inhalada por medio de amebas infectadas y, posteriormente, causar legionelosis. Esta vía de infección fue demostrada años más tarde, donde se encontraron amebas con legionelas internalizadas actuando como partículas infecciosas, capaces de provocar enfermedad pulmonar en un modelo murino (Brieland *et al.*, 1997). Cirillo *et al.* (1997) confirmaron que las ARB podrían pasar desapercibidas frente a la primera línea de defensa de un organismo, demostrando que la colonización del intestino de ratones era mayor cuando se inoculaban amebas viables con *Mycobacterium avium*.

Se estudió también cómo algunas bacterias permanecen viables intracelularmente en *Acanthamoeba* y son transportadas a huéspedes susceptibles. Incluso, en condiciones favorables, las bacterias fueron capaces de emerger de la ameba y llegar a reproducirse (Siddiqui & Khan, 2012). Más recientemente, se han podido detectar células viables de *H. pylori* y *L. pneumophila* en algunas FLA aisladas de muestras de aguas residuales y agua potable (Moreno-Mesonero *et al.*, 2017), y muestras de lechuga (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 a).

Teniendo en cuenta el anteriormente demostrado papel de las FLA como potencial vehículo de transmisión de bacterias patógenas, sería necesaria una mayor caracterización del microbioma de las amebas presentes en alimentos, para poder determinar si existe un riesgo asociado a las bacterias internalizadas.

### 1.3. Métodos moleculares para la detección e identificación de microorganismos

Hoy en día, el cultivo en placa o medio líquido sigue considerándose el “gold-standard” para algunas aplicaciones ya que estas técnicas se utilizan de forma rutinaria en controles de cumplimiento en hospitales, seguridad alimentaria y en ciertas industrias como la cosmética o farmacéutica (Emerson *et al.*, 2017).

No obstante, las técnicas independientes de cultivo, particularmente aquellas basadas en la secuenciación de DNA, permiten determinar con mayor resolución tanto la estructura como las funciones de las comunidades microbianas.

Se sabe que más de un 99% de los microorganismos existentes en el medio ambiente no son cultivables *in vitro* (Kimura, 2006). Adicionalmente, el tiempo de espera de detección de células por cultivo implica un retraso temporal, lo que supone un gran inconveniente cuando están en riesgo la salud y la seguridad. Por ello, intentando superar estas dificultades, se han desarrollado tecnologías moleculares independientes de cultivo como la secuenciación de nueva generación (NGS) o la qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) (Kimura, 2006).

### 1.3.1. Identificación de FLA mediante qPCR

La PCR cuantitativa es una variante de la PCR convencional que permite cuantificar los niveles de DNA mediante la amplificación a través de iniciadores específicos del gen de interés. En cada ciclo, la cantidad de producto formado o amplicón, se detecta mediante el uso de fluorescencia. Es una herramienta simple y rápida, más sensible que la PCR convencional y que permite monitorizar el progreso de la amplificación de DNA en tiempo real gracias al uso de sondas o reactivos fluorescentes (Ponchel *et al.*, 2003).

Las reacciones de qPCR requieren los mismos componentes que las de PCR convencional más un marcador fluorescente. Entre los distintos métodos de detección, los más utilizados en estudios de microbiología ambiental son SYBR Green I y sondas TaqMan (Kim *et al.*, 2013).

Esta técnica ha resultado altamente eficaz a la hora de detectar protozoos a partir de muestras alimentarias. Lalonde y Gajadhar (2016) detectaron en verduras de hoja verde y frutas del bosque, parásitos protozoarios como *Cryptosporidium*, *Cyclospora* y *Toxoplasma*. Así como Sim *et al.* (2017), quienes estudiaron la presencia de *Cryptosporidium* y *Cyclospora* mediante qPCR a partir de más de 400 muestras de seis tipos de vegetales distintos.

### 1.3.2. Metagenómica de secuenciación dirigida

La metagenómica consiste en el análisis del conjunto de genomas de una muestra y no requiere el cultivo de la comunidad microbiana (Kimura, 2006). Es una técnica relativamente nueva que ha surgido gracias al avance de la secuenciación de nueva generación (NGS). Este tipo de secuenciación es el único método que permite el estudio simultáneo de toda la comunidad microbiana de una muestra, posibilitando además la detección de microorganismos no cultivables. Por tanto, esta tecnología surge como una poderosa herramienta que supone una alternativa para estudiar el amplio porcentaje de las comunidades microbianas que ha permanecido fuera del alcance de la investigación durante años (Christensen, 2018).

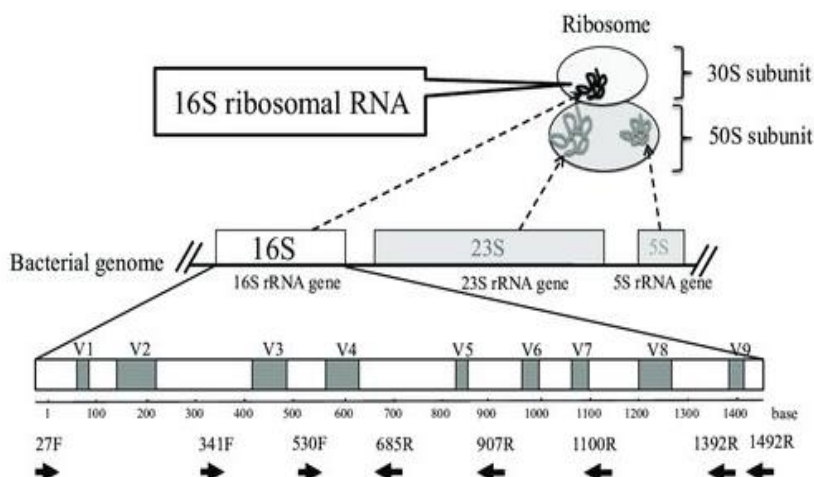
Además, las técnicas de NGS han permitido reducir los costes de secuenciación, posibilitando la realización de proyectos a gran escala como el “Earth Microbiome Project”, el cual se inició en 2010, con el objetivo de elaborar un catálogo global de la diversidad microbiana del planeta a partir del estudio de aproximadamente 200000 muestras ambientales (Gilbert *et al.*, 2014).

Existen distintas aproximaciones desde las que abordar un estudio metagenómico: secuenciación de genomas completos (Whole Genome Sequencing o WGS) y secuenciación dirigida a zonas concretas del genoma. Este segundo enfoque es el método más usado para caracterizar la diversidad microbiana (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 b).

#### 1.3.2.1. Gen 16S

El gen 16S rRNA es un marcador informativo a nivel taxonómico y filogenético y se utiliza habitualmente como objetivo de amplificación en los estudios de comunidades microbianas por diversos motivos (Fukuda *et al.*, 2016). En primer lugar, se encuentra presente en todas las especies del dominio Bacteria y se trata de un gen relativamente corto (aproximadamente 1500 pares de bases (pb)). Consta de nueve regiones hipervariables flanqueadas por regiones altamente conservadas (Figura 5). Las

primeras permiten discriminar entre microorganismos y clasificar taxonómicamente, mientras que las segundas son útiles para el diseño de cebadores universales.

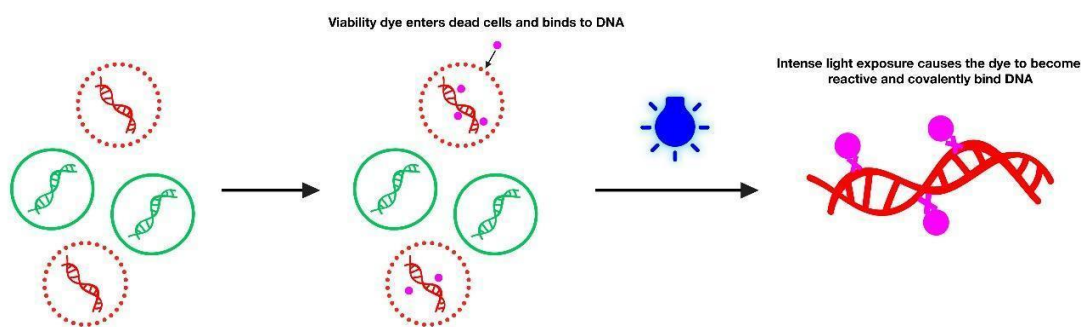


**Figura 5. Esquema del complejo ribosómico y del gen 16S rRNA.** Los recuadros blancos y grises indican las regiones conservadas y las regiones hipervariables (V1-V9), respectivamente. Las flechas en negrita muestran las posiciones aproximadas de los cebadores universales en la secuencia del gen 16S rRNA de *Escherichia coli*. Fukuda *et al.*, 2016.

Por otra parte, se dispone de bases de datos públicas con un amplio número de secuencias genéticas registradas y de calidad contrastada, las cuales están aumentando considerablemente (Fukuda *et al.*, 2016). La búsqueda de las secuencias obtenidas en bases de datos específicas para dicho gen, como SILVA o GreenGenes, permite llevar a cabo una clasificación taxonómica de los microorganismos presentes en las muestras.

#### 1.3.2.2. Tratamiento de Cloro y PMA

El PMA (monoazida de propidio) es un colorante fotorreactivo intercalante del DNA que se une irreversiblemente al DNA de las células con la membrana dañada o al DNA libre, impidiendo su posterior amplificación mediante PCR (Figura 6) (BIOTIUM, 2019). Por tanto, con el objetivo de secuenciar únicamente el microbioma interno de las FLA, podría emplearse un tratamiento con alta concentración de hipoclorito de sodio (dañando solo la membrana de las bacterias no internalizadas, pero no las amebas), seguido de un tratamiento de PMA, combinación que ha sido validada en estudios anteriores (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 b).



**Figura 6. Tratamiento con PMA.** La membrana es impermeable al PMA, haciéndolo específico de células muertas. En el interior de la célula muerta, se une al DNA y la exposición a una luz

visible intensa hace que se adhiera a este de forma covalente. Esta modificación del DNA evita la amplificación en reacciones de PCR posteriores. BIOTIUM, 2019.

### 1.3.2.3. Secuenciación Illumina

De entre las plataformas de secuenciación masiva, una de las más usadas para el estudio de las comunidades microbianas es la de Illumina, en la que se emplean diversos secuenciadores, entre los que destaca el secuenciador MiSeq. Sólo esta plataforma posibilita la secuenciación del amplicón por ambos extremos, lo cual permite una mayor cobertura, mayor número de secuencias y secuenciar amplicones de hasta 550 pb en el secuenciador MiSeq, ya que realiza lecturas de 300 pb por cada extremo (Christensen, 2018).

En otros proyectos de investigación anteriores, se han desarrollado y mejorado protocolos para el análisis de patógenos utilizando metagenómica dirigida por la tecnología Illumina MiSeq, demostrando con éxito que esta es una herramienta muy valiosa que proporciona información de calidad (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 b).

En un abordaje metagenómico de secuenciación dirigida al gen 16S rRNA, se extrae el DNA de la muestra que se desea caracterizar y se amplifica el gen marcador. Las secuencias amplificadas resultantes se secuencian y caracterizan bioinformáticamente para determinar qué microorganismos están presentes en una muestra y en qué abundancia relativa.

### 1.3.3. Análisis bioinformático. QIIME2

Para el análisis de las lecturas crudas generadas tras la secuenciación, existen diversos tipos de herramientas, entre las que destaca QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso *et al.*, 2010). Se trata de uno de los principales paquetes de software utilizados para el análisis del gen 16S rRNA en estudios microbiológicos. La versión actual de este *pipeline*, QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019), está basado en el lenguaje de programación Python y se encuentra configurado con una serie de módulos que permiten al usuario manipular y analizar los grandes conjuntos de datos de secuencias de alto rendimiento (Christensen, 2018).

El proceso de obtención de información de las lecturas crudas usando QIIME2 parte de un archivo que contiene información acerca de las muestras, necesario para su posterior identificación y eliminación de quimeras (secuencias de lectura fusionadas de dos orígenes distintos). El paso más importante es la formación de ASVs (Amplicon Sequence Variants), agrupaciones de secuencias que se forman entre secuencias altamente similares, a cada una de las cuales se asigna una taxonomía microbiana. Finalmente, se obtiene la abundancia relativa de cada ASV a diferentes niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, género y especie) (Christensen, 2018).

Hasta ahora, ningún estudio del microbioma de amebas de vida libre se ha llevado a cabo realizando el análisis bioinformático de los datos secuenciados empleando la herramienta QIIME2. Teniendo en cuenta que no existen protocolos de análisis universales, la optimización de esta herramienta es necesaria para su uso.

## 2. Objetivos

Como se ha descrito anteriormente, la presencia y diversidad de las FLA en los entornos de procesamiento de alimentos no está muy estudiada, al igual que su microbioma. Por tanto, la finalidad principal del presente estudio es determinar el microbioma de las amebas de vida libre recuperadas de vegetales orgánicos para estudiar su potencial riesgo para la Salud Pública.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Seguir un protocolo de aislamiento para recuperar FLA a partir de las muestras de alimentos ecológicos mediante cultivo.
- Identificar las FLA aisladas de las muestras de vegetales mediante qPCR.
- Determinar el microbioma de las FLA aisladas mediante el uso de metagenómica de secuenciación dirigida.
- Llevar a cabo la optimización de la herramienta bioinformática QIIME2 para el análisis de diversidad de comunidades microbianas, así como establecer un protocolo (*pipeline*) específico de análisis metagenómico para este proyecto.
- Establecer la composición taxonómica y la abundancia relativa de especies de cada muestra, prestando especial atención a las bacterias patógenas humanas.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Origen de las muestras de alimentos

Un total de 17 vegetales ecológicos como muestra representativa de verduras que se consumen crudas, fueron adquiridos en diferentes tiendas locales de la ciudad de Valencia desde Noviembre de 2020 a Mayo de 2021. De las muestras, 7 correspondieron a *Spinacia oleracea* (espinaca) y 10 a *Lactuca sativa* (lechuga), registradas con la nomenclatura E (espinaca) y L (lechuga) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Muestras procesadas y nomenclatura correspondiente.

Lechugas	Espinacas
L1	E2
L3	E4
L5	E5
L6	E6
L7	E7
L10	E8
L12	E12
L13	
L14	
L15	

#### 3.2. Preparación de las muestras

Se seleccionaron muestras representativas de cada vegetal (de 5 piezas distintas), pesando 50 g de las hojas intactas exteriores de espinacas y lechugas y se colocaron en una bolsa de Stomacher. Las muestras se procesaron y homogeneizaron en Stomacher (Mayo Homogenius HG 400), con 250 ml de tampón PAGE 1X, durante 3 minutos y a máxima velocidad.

Los 250 ml de cada muestra fueron filtrados empleando embudos de filtración y una rampa de filtración a través de membranas de nitrocelulosa Millipore con tamaño de poro de 1.2  $\mu\text{m}$ . El paso de filtrado de cada muestra se repitió 5 veces, filtrando cada vez 50 ml. A continuación, las membranas se transfirieron de forma estéril a placas Petri con medio Non-Nutrient Agar Page (NNAP) previamente preparadas, depositadas boca abajo. A las 24 horas se retiraron las membranas y las placas se incubaron a 30°C durante una semana.

#### 3.3. Aislamiento de FLA y visualización

Tras una semana de incubación, se observó el crecimiento de las amebas mediante el uso de un microscopio de contraste de fases. Para ello, se depositaron 2 gotas (~10-15  $\mu\text{l}$ ) de PBS estéril en un portaobjetos limpio y con un asa de siembra estéril, se frotó la placa de cultivo con medio NNAP (Anexo 1) para homogeneizar a continuación, con el líquido depositado en el portaobjetos. Para confirmar la presencia

de amebas de vida libre, se empleó un objetivo 40X con fase PH2. Se tomaron imágenes con una cámara digital (AxioCam ICc5 Zeiss) incorporada al microscopio.

### 3.4. Bloqueo de DNA bacteriano no internalizado. Tratamiento con PMA

Tras localizar la presencia de amebas, y con el objetivo de eliminar la amplificación del DNA procedente de las bacterias no internalizadas por las amebas y de DNA externo, se procedió a la aplicación de un tratamiento con propidio de monoazida (PMA) (Anexo 2) a las muestras FLA-positivas. Se añadió a estas placas 2 ml de PAGE 1X (Anexo 2) y con una espátula esterilizada, se recuperaron las amebas rascando por encima del agar intentando recoger la menor cantidad de este para facilitar la posterior extracción de DNA. El contenido de cada placa se transfirió a un microtubo de 1.5 ml para centrifugar a continuación a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 8 minutos. Tras eliminar el sobrenadante de cada muestra, se introdujo cada pellet en un único microtubo para volver a centrifugar de la misma forma.

Se introdujo en cada tubo 61.34 µl de hipoclorito de sodio a una concentración de 1630 ppm (mg/l) con 938.44 µl de PAGE 1X y se mezclaron los componentes con un agitador (Vortex Velp Scientifica). La solución se mantuvo en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. A los 45 minutos, el PMA se sacó de la nevera para incubarlo hasta su aplicación, conservado en oscuridad, a temperatura ambiente y mezclándolo ocasionalmente para permitir una mejor penetración del reactivo.

Pasada la hora, se centrifugó cada microtubo a 3000 rpm durante 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante quedando en cada uno de ellos un único pellet, el cual se resuspendió en 500 µl de PBS y 1.25 µl de PMA a una concentración de 20 mM.

Cada tubo se mantuvo en agitación y en oscuridad a temperatura ambiente en un agitador horizontal (IKA HS 501 D) durante 15 minutos. A continuación, las muestras se fotoactivaron mediante exposición a luz LED azul usando el equipo PhAST Blue (GenIUL, España) durante 15 minutos. Seguidamente, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió cada pellet en 200 µl de PBS filtrado (Anexo 2). Las muestras se congelaron a -80°C hasta la posterior extracción el DNA.

### 3.5. Extracción de DNA y secuenciación

La extracción del DNA bacteriano se llevó a cabo utilizando GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Alemania) (Anexo 2) siguiendo el protocolo de extracción de DNA de células de mamífero cultivadas, modificado (Moreno-Mesonero *et al.*, 2017) aumentando de 10 a 30 minutos el tiempo de incubación a 56°C para la lisis celular y eluyendo el DNA final en 50 µl de tampón de elución. En último lugar, se cuantificó la concentración del DNA extraído empleando el Fluorómetro Qubit (Invitrogen).

Para determinar el microbioma bacteriano de las amebas, se secuenció el DNA con la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq en el Servicio de Secuenciación y Bioinformática de la Fundación para el Fomento de la Investigación Biomédica, FISABIO, Valencia.

Se aplicó la estrategia de secuenciación dirigida al gen 16S del RNA ribosomal. Se realizó la preparación de la biblioteca de secuenciación metagenómica 16S (Parte # 15044223 Rev. B) utilizando el conjunto recomendado de cebadores (Tabla 4), dirigidos a las regiones V3-V4 del gen 16S y generando un único amplicón de unos 460 pb. La



secuenciación se llevó a cabo según el protocolo paired-end (2 x 300 pb) incluyéndose un control negativo de secuenciación.

**Tabla 4.** Secuencias nucleotídicas de los cebadores empleados en la secuenciación de las muestras. Takahashi *et al.*, 2014.

Cebador	Secuencia (5'-3')
341F	CCT ACG GGN GGC WGC AG
802R	TAC NVG GGT ATC TAA TCC

### 3.6. Detección de FLA mediante qPCR

Con el objetivo de identificar las especies de amebas aisladas a partir de las muestras de alimentos, se llevó a cabo la detección de las FLA más comunes, *Acanthamoeba castellanii* y *Vermamoeba vermiformis* por qPCR a partir de las muestras de DNA extraído.

Para la detección de *A. castellanii*, se utilizó el par de cebadores AcantF900 y AcantR1100 para la amplificación de un fragmento de 80 pb del gen 18S rRNA y la sonda TaqMan AcantP1000 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Secuencias nucleotídicas de los iniciadores y de la sonda TaqMan de *A. castellanii*.

Cebadores y sonda	Secuencia (5'-3')
AcantF900	CCC AGA TCG TTT ACC GTG AA
AcantR1100	TAA ATA TTA ATG CCC CCA ACT ATC C
AcantP1000	Cy5-CT GCC ACC GAA TAC ATT AGC ATG G-BHQ3

En el caso de *V. vermiformis*, se seleccionó una región del gen 18S rRNA y se amplificó un fragmento de 502 pb mediante los iniciadores Hv1227F y Hv1728R (Tabla 6).

**Tabla 6.** Secuencias nucleotídicas de los iniciadores de *V. vermiformis*.

Cebadores y sonda	Secuencia (5'-3')
Hv1227F	TTA CGA GGT CAG GAC ACT GT
Hv1728R	GAC CAT CCG GAG TTC TCG

En ambos casos, la reacción de qPCR se llevó a cabo en el termociclador LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, España), empleando el sistema comercial LightCycler® TaqMan® Master (Roche Applied Science, España).

Para *A. castellanii*, cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, que contenía 0,8 µl de cada primer (10 µM), 0,4 µl de la sonda (10 µM), 4 µl de LightCycler® TaqMan® Master Reaction mix (Roche Applied Science, España), 0,4 µl de BSA (1 mg/ml) y 3 µl de DNA. Se incluyó un control positivo en el que el DNA procedía de un DNA sintético de la curva patrón y un control negativo en el que el DNA

se reemplazó por agua estéril. La mezcla de reacción se sometió a las condiciones mostradas en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Condiciones de qPCR para la identificación de *A. castellanii*. Qvarnstrom *et al.*, 2006.

Fases	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	1	95	10 minutos
Desnaturalización		95	10 segundos
Unión de cebadores	40	63	8 segundos
Extensión		72	7 segundos
Enfriamiento	1	40	30 segundos

Para *V. vermiformis*, cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, que contenía 0,4 µl de cada primer (10 µM), 2 µl de LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, España), 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de BSA (4 mg/ml) y 4 µl de DNA. Se incluyó un control positivo en el que el DNA procedía de un DNA sintético de la curva patrón y un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua estéril. La mezcla de reacción se sometió a las condiciones mostradas en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Condiciones de qPCR para la identificación de *V. vermiformis*. Kuiper *et al.*, 2006.

Fases	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	1	95	10 minutos
Desnaturalización		95	10 segundos
Unión de cebadores	40	63	8 segundos
Extensión		72	7 segundos
		95	0 segundos
Curva fusión	1	65	15 segundos
		95	0 segundos
Enfriamiento	1	40	30 segundos

### 3.7. Metagenómica 16S rRNA

Dado que no existen protocolos estándar, se elaboró un protocolo bioinformático (*pipeline*) que se siguió durante todo el análisis metagenómico de las muestras (Anexo 3). Para ello, se probaron los distintos complementos (*plug-ins*) que ofrece el software QIIME2, y se optimizaron todos los parámetros de cada uno de ellos, consiguiendo un protocolo específico para el análisis del microbioma a partir de las muestras de alimentos de partida. Adicionalmente, previo al análisis definitivo de las muestras

ambientales, el *pipeline* diseñado fue validado empleando un *mock* o comunidad microbiana artificial.

Tras obtener las secuencias brutas, el procesamiento de datos se llevó a cabo empleando la línea de comandos de la terminal, de la versión 2020.11 de la herramienta QIIME2, instalada mediante la máquina virtual Oracle VM VirtualBox Administrador sobre el sistema operativo Ubuntu.

Previo al procesamiento, se elaboró un archivo de metadatos (*metadata file*) en formato tsv (separado por tabuladores) indicando de cada muestra el tipo de alimento (lechuga o espinaca) y la estación del año en la cual fue obtenida (primavera, otoño, invierno). Este archivo se validó por Keemei, un complemento de Excel que permite comprobar si cumple con las especificaciones de QIIME2.

En primer lugar, las secuencias presentes en el control negativo se eliminaron y las restantes secuencias *forward* y *reverse* se unieron mediante DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Este método permite eliminar a su vez, el ruido y las quimeras formadas durante el proceso de amplificación, y filtrar las secuencias por calidad. Fueron descartadas aquellas con valor menor de calidad phred Q30. Como resultado de este paso, se creó un *clustering* (agrupamiento) de las secuencias en ASVs (Amplicon Sequence Variants), las cuales se definieron al 99 % de similitud de secuencia. Posteriormente, se llevó a cabo una filtración para eliminar el DNA eucariota de cloroplastos y mitocondrias.

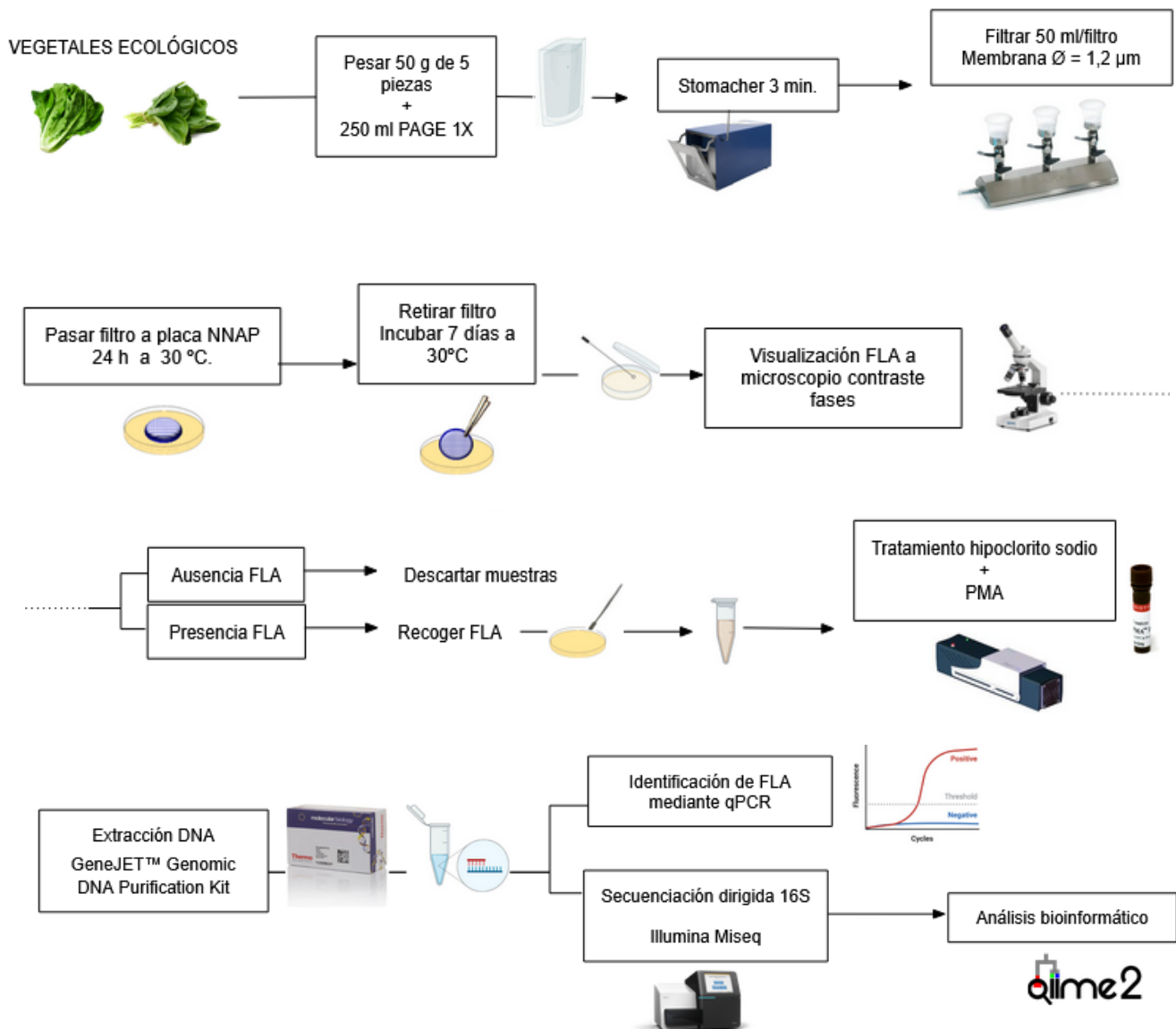
A continuación, las ASVs creadas se sometieron a una asignación taxonómica mediante *classify-consensus-blast* (Camacho *et al.*, 2009). Este *plug-in* realiza un alineamiento local entre las secuencias proporcionadas y la base de datos de referencia indicada. Para ello, se utilizó la versión 138 de la base de datos Silva r132 y las ASVs se definieron con un 97% de identidad de secuencia.

### 3.8. Análisis de la comunidad microbiana

Para poder comparar las muestras en igualdad de condiciones, estas se normalizaron con una profundidad de secuenciación de 41700 lecturas. Posteriormente, se calcularon para cada muestra las curvas de rarefacción (diversidad de especies) y el índice de diversidad alfa *Observed features*.

Se llevó a cabo un análisis de diversidad alfa para estimar la diversidad y riqueza de especies de cada muestra, y un análisis de diversidad beta, para establecer las diferencias de comunidades microbianas entre ambos tipos de alimento (lechugas y espinacas). También se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para visualizar las diferencias en la composición de la comunidad bacteriana entre las muestras. En último lugar, se procedió a la obtención del *core microbiome*, es decir, los taxones bacterianos compartidos por todas las muestras. Las representaciones gráficas se realizaron usando Microsoft Excel 2020.

El protocolo de trabajo seguido durante el proyecto se encuentra representado en la Figura 7.



**Figura 7.** Esquema de trabajo seguido durante el estudio.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Procesado de muestras

Se analizaron un total de 17 muestras: 7 de espinacas y 10 de lechugas. El método empleado en el procesado de muestras permitió el análisis de todas ellas. Todo el volumen homogeneizado (250 ml) en Stomacher de los 50 g de cada muestra se pudo filtrar a través de las membranas.

Sin embargo, otros autores utilizan generalmente menor cantidad de muestra para el procesado de los alimentos. Moreno-Mesonero *et al.* (2020 a) homogeneizaron 10 g de las hojas exteriores de muestras de lechuga con 90 ml de solución salina amébica de Page (PAS). Por otra parte, Chavatte *et al.* (2016) emplearon 1 ml del homogeneizado de muestras de vegetales en PAS para aislar amebas de vida libre. Mientras que Gourabathini *et al.* (2008) para el aislamiento de FLA, lavaron hojas de lechuga y espinaca con una solución salina y transfirieron posteriormente alícuotas de esta a placas NNAP.

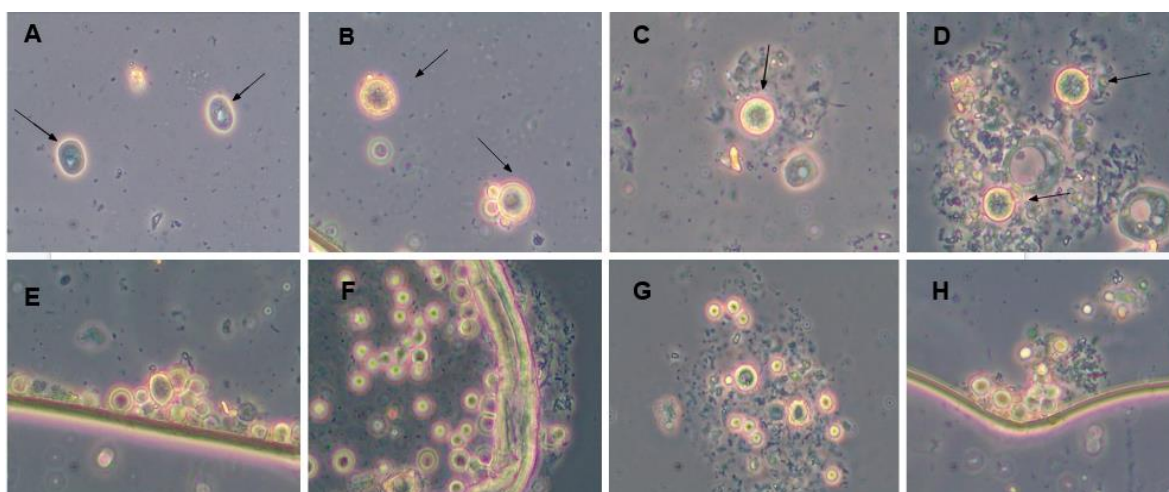
### 4.2. Cultivo de FLA

Uno de los principales métodos empleados para obtener cultivos de FLA a partir de muestras consiste en cultivarlas en placas NNA (Non-Nutrient Agar) en presencia de *Escherichia coli*. No obstante, esta técnica alteraría los resultados de la secuenciación basada en el gen 16S rRNA. Por ello, otros autores como Delafont *et al.* (2013), sembraron placas de NNA con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, sin afectar a su análisis. No obstante, en el presente estudio, al igual que Moreno-Mesonero *et al.* (2020 a), las placas no se sembraron con ningún tipo de microorganismo y, por tanto, el microbioma de las FLA no se vio alterado. A pesar de ello, fue posible aislar FLA de los vegetales orgánicos, dado que el homogeneizado obtenido a partir de estos, contiene bacterias que sirven como fuente de alimento para las amebas.

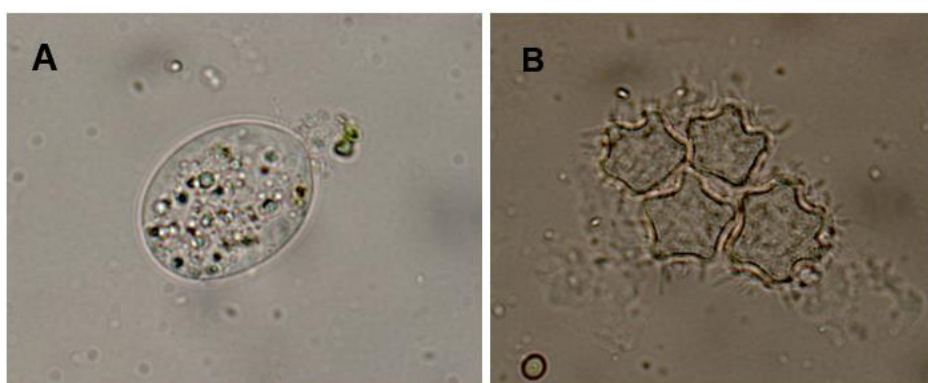
En el 100% de las muestras procesadas, tanto de lechuga como de espinacas, se pudo observar crecimiento de amebas de vida libre. La morfología más observada fue la de quiste y a menudo las FLA se observaron en pequeños grupos (Figura 8). Dado que el morfotipo de trofozoito no se identificó al microscopio con la misma frecuencia, esto es indicativo de que el medio con limitación de nutrientes (NNAP) provocó el enquistamiento de las amebas, manteniendo los microorganismos ingeridos en su interior e impidiendo que fueran excretados. Microscópicamente se llegó también a identificar amebas pertenecientes a los géneros *Vannella* y *Acanthamoeba*, caracterizadas estas últimas por su quiste con morfología estrellada (Figura 9).

Pocas investigaciones han estudiado la presencia de FLA en alimentos, y más concretamente, en vegetales. En otros estudios, coincidiendo con el presente trabajo, todos los cultivos fueron positivos para la presencia de FLA tras una semana de incubación (Vaerewijck *et al.*, 2011; Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 a). No obstante, en otros trabajos, la abundancia de amebas fue inferior. Chavatte *et al.* (2016) analizaron la presencia de FLA en vegetales, encontrándolas en un 68% de las muestras. Mientras que Gourabathini *et al.* (2008) estudiaron la prevalencia de protozoos en muestras de lechuga y espinacas, identificando la presencia de FLA en muy pocas de ellas. Estos autores propusieron que la abundancia de amebas se encontraba subrepresentada. Dado que las FLA tienden a adherirse a las superficies, una etapa de homogeneización

vigorosa como la realizada con Stomacher en el presente estudio, resulta más adecuada que el método de lavado empleado por los autores.



**Figura 8. Fotografías en microscopio de contraste de fases (40x).** (A, B) FLA aisladas de muestras de lechuga. (C, D) FLA aisladas de muestras de espinaca. Las flechas señalan las amebas de vida libre. (E, F, G, H) Alta densidad de FLA.



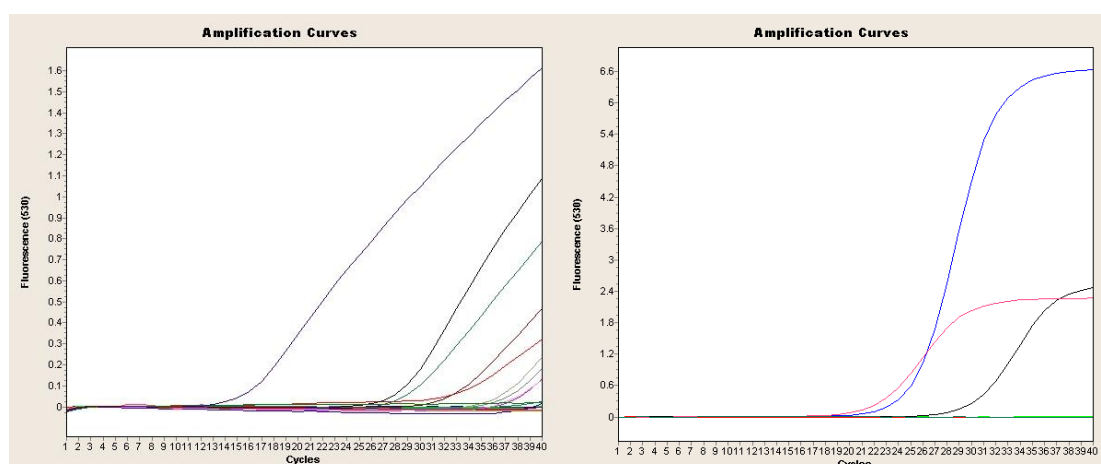
**Figura 9.** Fotografía en microscopio de contraste de fases (100X) de una *Vannella* (izquierda) y *Acanthamoeba* (derecha) en muestras de vegetales ecológicos.

#### 4.3. Identificación de FLA patógenas

Tanto *Acanthamoeba castellanii* como *Vermamoeba vermiformis* se identificaron mediante qPCR a partir del DNA extraído tras el tratamiento con PMA. Se detectó la presencia de *A. castellanii* en el 53% de las muestras analizadas, y de *V. vermiformis* en el 13% de estas (Tabla 9). Las respectivas curvas de amplificación se encuentran representadas en la Figura 10. No obstante, la presencia en vegetales orgánicos de estas FLA no supone un riesgo directo para la salud humana por la ingesta de los mismos, ya que estas no son capaces de causar infección por el hecho de ingerirlas, sino por otras vías de entrada como los ojos, las fosas nasales o úlceras y lesiones en la piel (CENTERS OF DISEASE AND CONTROL, 2019).

**Tabla 9.** Resultado de la presencia de FLA patógenas por qPCR.

Muestra	<i>A. castellanii</i>	<i>V. vermiformis</i>
L1	-	-
L3	-	-
L6	+	-
L7	+	-
L12	-	-
L13	+	-
L14	-	-
L15	+	+
E2	-	-
E4	+	-
E5	-	-
E6	+	-
E7	+	-
E8	+	+
E12	-	-

**Figura 10.** Curva de amplificación de qPCR de *A. castellanii* (izquierda) y *V. vermiformis* (derecha).

Debido a que existen muy pocos estudios que investigan la presencia de FLA en muestras de vegetales, los resultados obtenidos en este trabajo no pueden ser debidamente contrastados. A pesar de que actualmente ningún trabajo ha detectado la presencia de *A. castellanii* y *V. vermiformis* mediante qPCR en alimentos orgánicos, otros autores han sido capaces de identificar estas FLA mediante otros métodos.

Contrastando con el presente estudio, Vaerewijck *et al.* (2011) identificaron microscópicamente *V. vermiformis* en muestras de lechuga, pero no fueron capaces de detectar ninguna especie de *Acanthamoeba*. Sin embargo, Napolitano y Colletti-Eggolt (1984) detectaron *Acanthamoeba* como uno de los géneros más abundantes de FLA en diversos tipos de lechuga. Coincidiendo con los resultados obtenidos, Chavatte *et al.* (2016) identificaron morfológicamente tanto *Acanthamoeba* spp. como *Vannella* spp. en el 100% de las muestras de cuatro de los ocho vegetales que estudiaron.

#### 4.4. Microbioma bacteriano de las FLA

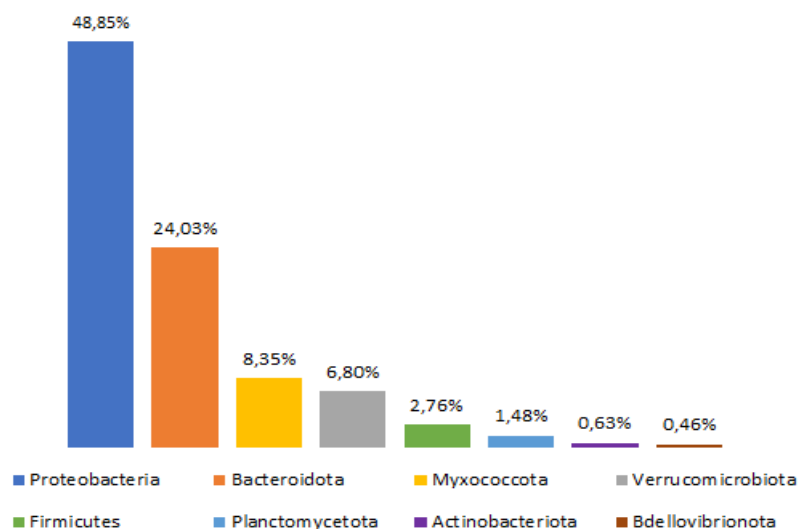
El bloqueo del DNA bacteriano no internalizado utilizando PMA tras un tratamiento con alta concentración de hipoclorito de sodio, permitió detectar sólo las bacterias internalizadas en la FLA. Sin embargo, dado que la técnica empleada está basada en la amplificación del DNA, la detección de DNA residual procedente de bacterias fagocitadas y digeridas no se puede excluir, tal y como sugieren algunos autores (Delafont *et al.*, 2013; Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 a).

Hasta ahora, ningún estudio del microbioma de FLA ha utilizado el software QIIME2 para llevar a cabo el análisis de la comunidad microbiana. Por ello, la optimización de esta herramienta se llevó a cabo desde cero. El laborioso trabajo de optimización de QIIME2 dio lugar al desarrollo de un protocolo específico para este proyecto, que permitió analizar el microbioma de las amebas aisladas de la totalidad de muestras de vegetales orgánicos.

Tras la secuenciación de Illumina MiSeq se obtuvo un total de 2265718 lecturas, y como resultado de la eliminación de quimeras y filtración de calidad, el total de secuencias se redujo a 1358657, que fueron agrupadas en 6596 ASVs. A continuación, se estudió la composición taxonómica de las muestras a diferentes niveles: filo, clase y género.

Hasta ahora, este es el segundo trabajo que estudia el microbioma de FLA aisladas a partir de vegetales, siendo la primera vez que se hace a partir de muestras de espinacas. De los tres estudios anteriores del microbioma de amebas, Delafont *et al.* (2013), y Moreno-Mesonero *et al.* (2020 b) utilizaron también la secuenciación masiva. No obstante, en el caso de Delafont *et al.*, los cebadores empleados fueron distintos a los utilizados en el presente estudio, y tanto ello como Moreno-mesonero *et al.*, llevaron a cabo el análisis a partir de agua potable y agua residual, respectivamente. Por tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo tan sólo son comparables a los del estudio de Moreno-Mesonero *et al.*, (2020 a) a partir de lechugas.

En promedio, los filos bacterianos más abundantes presentes en las muestras de vegetales fueron Proteobacteria, Bacteroidota, Myxococcota, Verrucomicrobiota, Firmicutes, Planctomycetota, Actinobacteriota y Bdellovibrionota, los cuales representaban el 93.36% de la diversidad de las muestras. Proteobacteria es altamente dominante, representando casi el 50% de las secuencias totales (Figura 11).

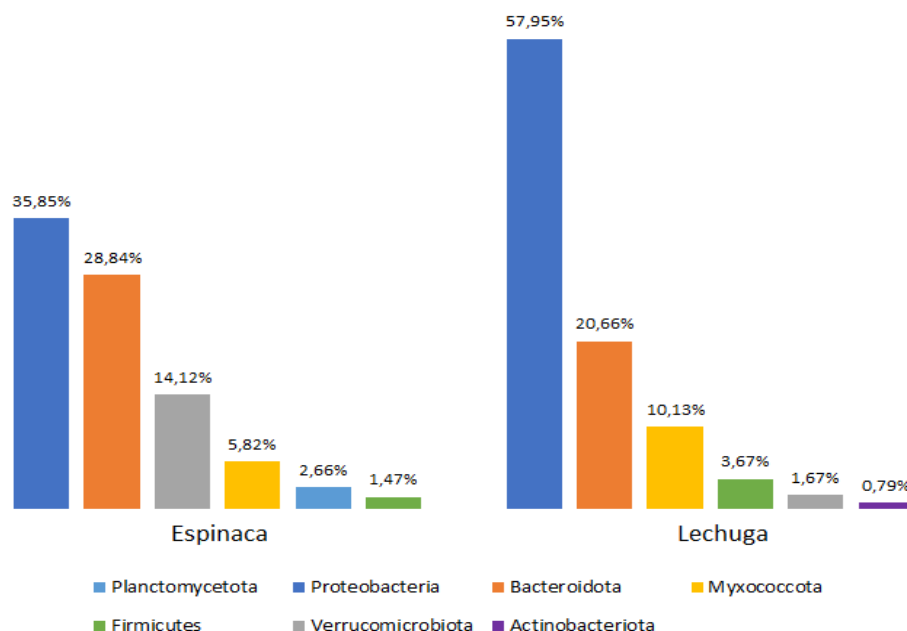


**Figura 11.** Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras.



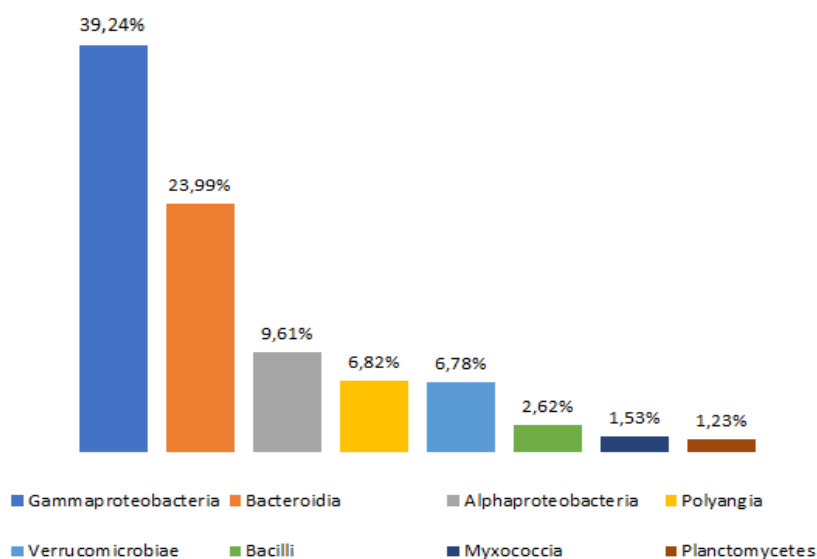
El filo Proteobacteria fue el de mayor abundancia tanto en las muestras de espinaca como de lechuga, al igual que el filo Bacteroidota, siendo el segundo más abundante en ambos casos. En tercer lugar, mientras que en espinacas dominaba el filo Verrucomicrobiota, en lechugas el dominante fue el filo Myxococcota (Figura 12).

Moreno-Mesonero *et al.*, (2020 a) encontraron que la mayor parte de las bacterias identificadas pertenecían a los filos Proteobacteria y Bacteroidota, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio a nivel de filo.



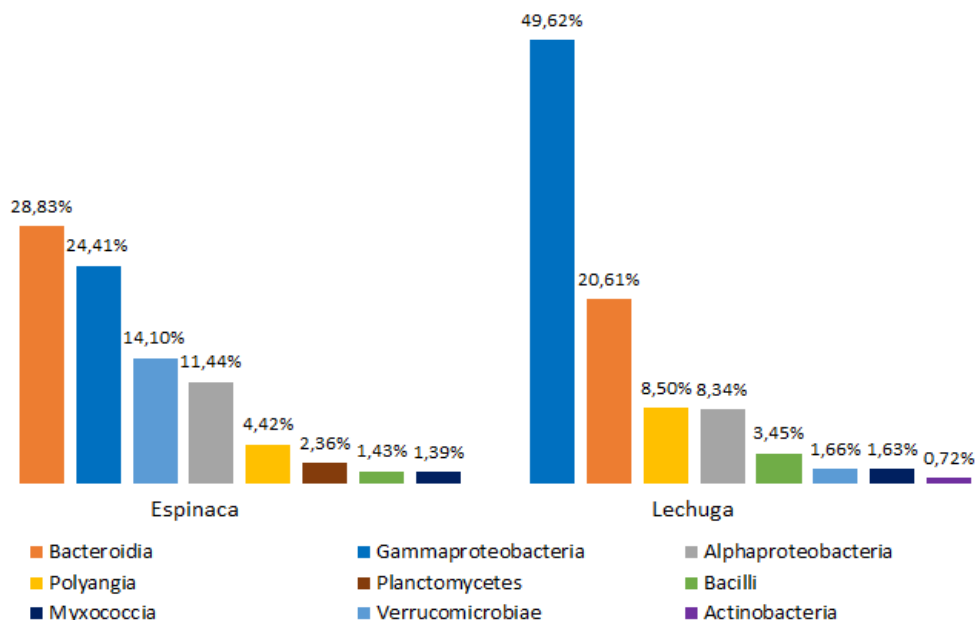
**Figura 12.** Distribución de los filos más abundantes de las muestras de espinaca (izquierda) y lechuga (derecha).

Las clases de bacterias más abundantes asociadas con FLA en el promedio de las muestras fueron Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Alphaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Polyangia, Verrucomicrobiae, Bacilli, Myxococcia y Planctomycetes, representando el 91.83% de la diversidad de las muestras (Figura 13). Las clases restantes se encontraron en una abundancia relativa menor del 1%.



**Figura 13.** Distribución de las clases más abundantes del promedio de las muestras de vegetales ecológicos.

Cuando se analizaron individualmente, las clases más abundantes en cada tipo de muestra también fueron Gammaproteobacteria y Bacteroidia, pero en diferentes abundancias relativas. En las muestras de lechuga predominó la clase bacteriana Gammaproteobacteria, casi en una proporción dos veces superior que en las muestras de espinaca, mientras que en estas últimas la clase dominante resultó ser Bacteroidia (Figura 14).

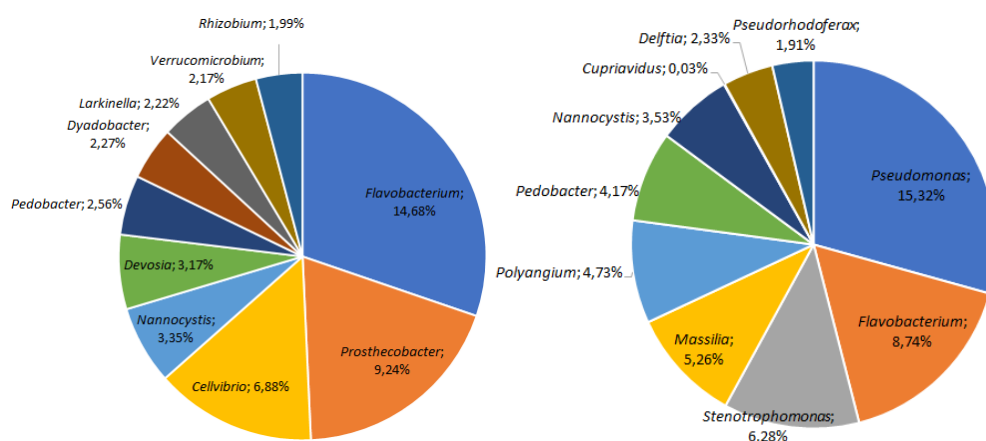


**Figura 14.** Distribución de las clases más abundantes del promedio de muestras de espinaca (izquierda) y lechuga (derecha).

La distribución a nivel de género resultó muy heterogénea. Los géneros bacterianos más abundantes en el promedio de las muestras fueron *Flavobacterium* (10.65%), *Pseudomonas* (9.57%), *Stenotrophomonas* (4.44%), *Prostheco bacter* (4.42%), *Pedobacter* (3.52%), *Cellvibrio* (3.42%), *Nannocystis* (3.41%), *Massilia* (3.41%), *Polyangium* (3.04%), *Dyadobacter* (2.09%), *Delftia* (1.85%), *Rhizobium* (1.85%), *Devosia* (1.79%), *Achromobacter* (1.65%), *Pseudorhodoferax* (1.65%), y *Cupriavidus* (1.40%) que representaron el 58.17% del promedio de las muestras. De los géneros detectados, *Massilia*, *Flavobacterium*, *Pseudorhodoferax*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* y *Delftia*, coinciden entre los más abundantes obtenidos por Moreno-Mesonero *et al.*, (2020 a).

Analizando por separado el promedio de géneros más representados en cada tipo de alimento, se puede observar una diferencia tanto en composición como abundancia relativa. En lechugas el género más abundante fue *Pseudomonas* (15.32%) y en espinacas *Flavobacterium* (14.68%). El resto de los géneros predominantes se encuentran representados en la Figura 15.

Coincidiendo con Moreno-Mesonero *et al.* (2020 a), en las muestras de lechugas destacaron entre los géneros más abundantes *Massilia*, *Flavobacterium*, *Pseudorhodoferax*, *Stenotrophomonas* y *Delftia*.



**Figura 15.** Distribución de los géneros más abundantes del promedio de muestras de espinaca (izquierda) y lechuga (derecha).

Dentro de los géneros detectados en todas las muestras, se ha encontrado previamente que *Flavobacterium*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rhizobium*, *Massilia* y *Stenotrophomonas* interactúan con FLA (Greub & Raoult, 2004; Delafont *et al.*, 2013; Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 a).

Sin embargo, entre las bacterias identificadas, se encuentran diversos géneros que no se habían descrito como los más abundantes asociados a FLA con anterioridad (Tabla 10). Estos representan casi el 20% de la abundancia total de géneros, indicando que la estrategia seguida es una técnica potente para describir una nueva diversidad bacteriana en las amebas de vida libre.

**Tabla 10.** Géneros más abundantes en el promedio de las muestras previamente no identificados.

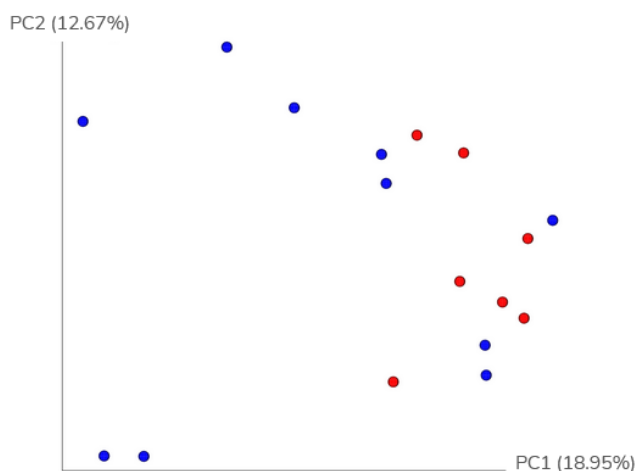
Género bacteriano	Abundancia relativa
<i>Prosthecobacter</i>	4.42%
<i>Pedobacter</i>	3.52%
<i>Cellvibrio</i>	3.42%
<i>Nannocystis</i>	3.41%
<i>Polyangium</i>	3.04%
<i>Dyadobacter</i>	2.09%
<i>Devosia</i>	0.02%
<i>Cupriavidus</i>	0.01%

Tras la obtención del *core microbiome*, los géneros bacterianos compartidos por el 100% de las muestras fueron tres: *Acidovorax*, *Achromobacter* y *Pseudorhodoferax*. Esto sugiere que dichos géneros se encuentran presentes tanto en lechugas como espinacas independientemente de la época del año.

Estos tres géneros también fueron encontrados en todas las muestras analizadas por Moreno-Mesonero *et al.*, (2020 a). Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio, ellos identificaron 21 géneros presentes en todas las muestras.

Respecto a la diversidad beta, el valor  $p$  del análisis resultó ser de 0.037 ( $< 0.05$ ), indicando que existen diferencias significativas en las comunidades bacterianas en función del tipo de muestra (espinacas o lechugas). Esto podría explicar el reducido número de géneros compartidos por todas las muestras vegetales en el presente estudio.

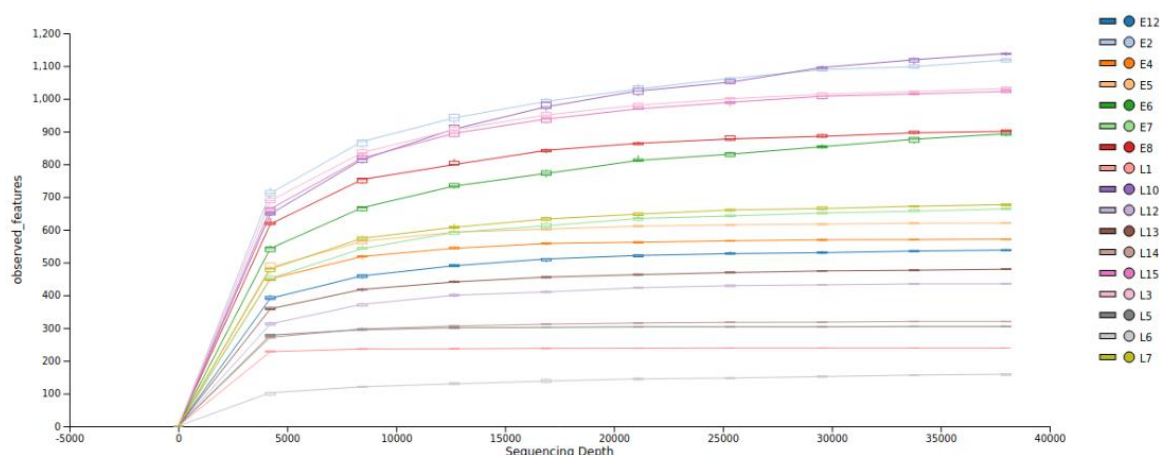
El PCA obtenido se encuentra representado en la Figura 16. Como se observa, a pesar de que las muestras representadas en rojo (correspondientes a las de espinacas ecológicas) forman un grupo muestral más homogéneo, no existe un claro agrupamiento de las muestras en función del tipo de alimento. No obstante, ciertas muestras representadas en azul se encuentran alejadas del resto. Esto indica que son las causantes de una mayor variabilidad de géneros observada entre ambos tipos de muestra, y con ello, contribuyendo a un *core microbiome* más reducido.



**Figura 16.** Análisis de componentes principales. Leyenda (tipo de alimento): rojo = espinaca, azul = lechuga.

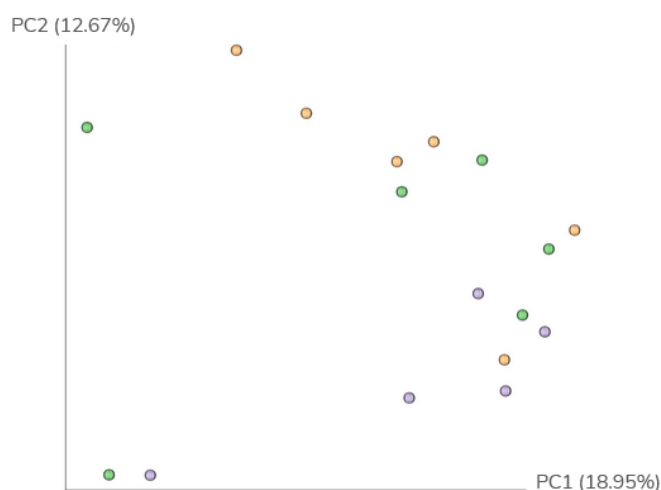
También se utilizó el análisis de diversidad alfa para reflejar la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas detectadas como parte del microbioma de las FLA. La comparación entre los índices de diversidad alfa de la composición bacteriana en las muestras de vegetales, no mostró diferencias significativas, presentando un valor  $p$  de 0.14 ( $> 0.05$ ). Esto no implica que la composición bacteriana sea idéntica en el mismo tipo de muestras, sino que sugiere que los perfiles microbianos presentes en el mismo tipo de alimento tienen la misma cantidad de diversidad.

En cuanto a las curvas de rarefacción obtenidas tras el proceso de normalización, estas demuestran que la diversidad general no cambia significativamente al aumentar la profundidad de lectura tras 15000 lecturas (Figura 17). A un nivel de rarefacción de 30000 secuencias por muestra, las curvas prácticamente se han estabilizado, indicando una representación completa de las comunidades bacterianas dentro de cada muestra. Todas las muestras de bacterias ambientales se mantuvieron en este nivel de rarefacción.



**Figura 17.** Curvas de rarefacción para todas las muestras representando el índice de diversidad alfa *Observed-features*.

Cabe destacar también, que como puede observarse en el PCA obtenido tras el análisis, no se observan agrupamientos claros en función de la estación en la que fue recogida cada muestra (Figura 18).



**Figura 18.** Análisis de componentes principales. Leyenda (estación del año): naranja = otoño, verde = invierno, morado = primavera.

#### 4.5. Identificación de patógenos

Algunos de los géneros identificados en este estudio son de interés para la Salud Pública porque contienen especies que son patógenas para el ser humano. Estableciendo una comparación entre los géneros obtenidos tras el análisis y los datos de la agencia CDC (CENTROS PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES, 2021), se llegaron a identificar hasta 52 géneros bacterianos potencialmente patógenos, representando el 34% de la abundancia total de géneros establecidos (Tabla 13, Anexo 4). Los 20 géneros más abundantes en el promedio de las muestras se encuentran representados en la Tabla 11.

De los cuatro principales microorganismos patógenos transmitidos a través de los alimentos (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Escherichia. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*) (Vaerewijck *et al.*, 2011), tan solo se identificó el género *Salmonella* (Tabla 13).

**Tabla 11.** Bacterias de interés para la Salud Pública más abundantes presentes en las muestras de vegetales orgánicos.

Género	Promedio	Muestras de espinaca	Muestras de lechuga
<i>Flavobacterium</i>	10.649%	14.680%	7.828%
<i>Pseudomonas</i>	9.569%	1.184%	15.439%
<i>Stenotrophomonas</i>	4.438%	1.195%	6.708%
<i>Delftia</i>	1.853%	1.129%	2.360%
<i>Achromobacter</i>	1.653%	1.172%	1.989%
<i>Acidovorax</i>	0.902%	1.001%	0.833%
<i>Paenibacillus</i>	0.755%	1.183%	0.455%
<i>Brevundimonas</i>	0.702%	0.654%	0.736%
<i>Sphingomonas</i>	0.701%	0.441%	0.883%
<i>Acinetobacter</i>	0.699%	0.427%	0.890%
<i>Legionella</i>	0.501%	0.163%	0.737%
<i>Comamonas</i>	0.437%	0.361%	0.491%
<i>Enterobacter</i>	0.272%	0.074%	0.411%
<i>Sphingobacterium</i>	0.262%	0.332%	0.214%
<i>Chryseobacterium</i>	0.250%	0.059%	0.383%
<i>Bacillus</i>	0.247%	0.057%	0.379%
<i>Rickettsia</i>	0.110%	0.096%	0.121%
<i>Pantoea</i>	0.091%	0.023%	0.138%
<i>Staphylococcus</i>	0.087%	0.033%	0.125%
<i>Citrobacter</i>	0.071%	0.018%	0.109%

Muchos de los géneros de bacterias de importancia para la Salud Pública detectadas como parte del microbioma bacteriano en este trabajo, han sido previamente identificados como ARBs (bacterias resistentes a las amebas) por su capacidad de sobrevivir dentro de las FLA tras ser internalizadas por estas (Gourabathini *et al.*, 2008).

Entre todos los géneros, *Flavobacterium* presentó la mayor abundancia relativa. Este género contiene especies patógenas, entre las que se encuentra *Flavobacterium meningosepticum*, causante de diversas infecciones nosocomiales como meningitis o endocarditis (Ratner, 1984). *Flavobacterium psychrophilum* también es un patógeno humano que se ha detectado de forma ocasional en muestras de agua, biofilms o sedimentos de ríos que reciben aguas de salida de piscifactorías infectadas (Duchaud *et al.*, 2007).

El segundo género potencialmente patógeno identificado fue *Pseudomonas*. Entre las especies patógenas humanas incluidas en este género se encuentra

*Pseudomonas aeruginosa*, una especie oportunista con capacidad de adaptarse a una gran variedad de entornos y que causa infecciones nosocomiales, la mayoría de ellas asociadas a huéspedes con el sistema inmunológico comprometido. Esta bacteria se ha relacionado previamente con las FLA y ha sido identificada como ARB (Delafont *et al.*, 2013).

*Legionella* también es uno de los géneros patógenos más estudiados asociados a FLA. La bacteria patógena *Legionella pneumophila* es una ARB común, causante de una neumonía grave que puede resultar mortal. En el presente estudio representó casi el 0.5% de las secuencias. Este patógeno humano puede escapar de la digestión de las FLA y multiplicarse en amebas como *Acanthamoeba castellanii* y *Vermamoeba vermiformis* (Vaerewijck *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2019).

Entre los posibles géneros patógenos bacterianos encontrados en los vegetales, se ha demostrado previamente la presencia en el interior de amebas de *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Salmonella* (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020 a). Por tanto, los restantes géneros de la Tabla 13 han sido identificados por primera vez mediante secuenciación dirigida como parte del microbioma de las FLA aisladas a partir de lechugas y espinacas ecológicas.

Sin embargo, a pesar de ser una metodología ampliamente utilizada, presenta ciertas limitaciones. Esta aproximación solo brinda información de la composición taxonómica, y por tanto, los microorganismos nuevos o muy divergentes son difíciles de estudiar con este método.

Adicionalmente, cada región variable del gen 16S rRNA puede tener diferente poder de resolución a nivel taxonómico. Por ello, llevar a cabo un estudio limitándose a unas pocas de estas regiones puede influir en el resultado final, y no ser comparable con otros experimentos que usan otras regiones variables (Sharpton, 2014). Este gen consta aproximadamente de 1500 pb, y en el presente estudio se secuenció únicamente la región V3-V4, de unas 460 pb.

A pesar de que en anteriores estudios, secuenciando tan solo este gen, han sido capaces de identificar hasta nivel de especie (Jia *et al.*, 2021), en el presente trabajo la asignación taxonómica sólo puede considerarse fiable hasta nivel de género. Por ello, con el objetivo de identificar con mayor fiabilidad y corroborar la presencia de especies patógenas en el microbioma de las FLA, la secuencia de cada ASV de las especies detectadas se enfrentó contra la base de datos NCBI mediante la herramienta BLAST. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Abundancia relativa de especies patógenas bacterianas identificadas mediante BLAST.

Especie	Promedio	Muestras de espinaca	Muestras de lechuga
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0.0028%	0.0000%	0.0047%
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.0039%	0.0026%	0.0049%
<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.0118%	0.0000%	0.0201%
<i>Comamonas terrigena</i>	0.0390%	0.0163%	0.0549%
<i>Comamonas testosteroni</i>	0.0006%	0.0000%	0.0010%
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.3213%	0.4540%	0.2284%
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0.0155%	0.0000%	0.0263%
<i>Legionella pneumophila</i>	0.3722%	0.0043%	0.6298%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.0004%	0.0009%	0.0000%
<i>Pantoea agglomerans</i>	0.0010%	0.0000%	0.0017%
<i>Pseudomonas mendocina</i>	0.0005%	0.0012%	0.0000%
<i>Pseudomonas putida</i>	0.1671%	0.0966%	0.2164%
<i>Rahnella aquatilis</i>	0.0003%	0.0000%	0.0004%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.0311%	0.0131%	0.0436%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.7577%	0.5575%	0.8978%

Los géneros identificados contienen algunas especies que se encuentran clasificadas en el grupo de riesgo 2. Es decir, pueden causar enfermedades humanas, pero generalmente hay poca probabilidad de suponer una amenaza para el personal de laboratorio, la población o el medio ambiente. Este sería el caso de *Bacillus thuringiensis*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas mendocina*, *Staphylococcus epidermidis* o *Stenotrophomonas maltophilia*. Sin embargo, otros potenciales patógenos identificados, como *Rickettsia* o *Mycobacterium*, se incluyen en el grupo de riesgo 3, presentando un riesgo comunitario bajo, pero riesgo individual alto (COMISIÓN ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN, 2021).

Sin embargo, dada la naturaleza ambiental de las muestras, no se esperaba encontrar una diversidad tan amplia y una presencia tan significativa de géneros bacterianos potencialmente patógenos. Al haber sido internalizados por las amebas, esto sugiere que han llegado a coexistir con estas en los mismos ambientes. No obstante, se debe tener en cuenta que mediante la herramienta QIIME2 no se ha llegado a identificar la población bacteriana a nivel de especie en todos los casos, y por ello, algunos microorganismos internalizados por las amebas pueden corresponder a especies no patógenas de los géneros identificados. El fragmento secuenciado del gen 16S rRNA en estos casos, probablemente quedaría escaso para poder llevar a cabo una identificación precisa a nivel de especie. Por ello, sería necesario mejorar la calidad de la asignación taxonómica para poder afirmar la presencia real de especies patógenas presentes en el microbioma de FLA. Sería indispensable en ese caso, estudiar también la viabilidad de dichas bacterias en el interior de las amebas.



Cabe destacar por otra parte, que en el anterior estudio de Moreno-Mesonero *et al.*, (2016), se llegó a identificar en muestras de lechuga la presencia de bacterias patógenas como *Helicobacter pylori* en el interior de las amebas, mediante técnicas como la qPCR. Sin embargo, mediante metagenómica de secuenciación dirigida, no fue posible detectar dicha bacteria en las mismas muestras. Esto podría deberse al hecho de que la abundancia relativa de ciertas bacterias es tan baja en las muestras, que al producirse la amplificación previa a la secuenciación del DNA, otros DNAs presentes más abundantes enmascaran los taxones menos representados, produciéndose una amplificación preferencial de los primeros.

Esto indica, por tanto, que para el estudio de los grupos de bacterias asociadas a FLA más abundantes, la metagenómica de secuenciación dirigida, tal y como se ha empleado en este trabajo, resulta una herramienta muy potente. Sin embargo, si el objetivo fuera estudiar la presencia de ciertas bacterias con abundancias relativas bajas, esta estrategia parece no ser la mejor opción a emplear, y resultan más eficientes otras técnicas moleculares como la qPCR (Moreno-Mesonero, 2018).

Se debe remarcar también, que los resultados obtenidos en este novedoso estudio representan una aproximación del microbioma de las FLA aisladas de distintos tipos de vegetales orgánicos. Para generar unos resultados más exactos según el tipo de muestra, sería necesario analizar una mayor cantidad de estas.

## 5. Conclusiones

A raíz de los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

1. La totalidad de los vegetales orgánicos analizados contienen amebas de vida libre.
2. La identificación de *Acanthamoeba castellanii* (53%) y *Vermamoeba vermiformis* (13%) mediante sus respectivas qPCRs resulta efectiva en muestras de vegetales orgánicos, siendo innecesario llevar a cabo cultivos puros de cada FLA para obtener una identificación precisa.
3. El *pipeline* desarrollado con QIIME2 ha permitido el análisis de las secuencias del microbioma bacteriano de las FLA. A partir de los datos de secuenciación se ha conseguido determinar la composición taxonómica y abundancia relativa de todas las secuencias obtenidas del DNA interno de FLA de vegetales.
4. Los resultados obtenidos indican que el análisis de regiones variables del gen 16S rRNA resulta útil para el estudio de la diversidad bacteriana internalizada por las FLA hasta el nivel de género, pero su resolución es insuficiente para obtener una asignación precisa a nivel de especie.
5. Entre el microbioma de las FLA se detectaron bacterias patógenas humanas, lo que indica que las amebas son portadoras de dichos patógenos y pueden actuar como vehículos de transmisión, causando problemas de Salud Pública. Sería necesario demostrar la viabilidad y poder infectivo de las bacterias identificadas para determinar el riesgo real para el consumidor.

En concordancia con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), y en concreto, con el objetivo 3, “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades”, la diversidad y dinámica de las comunidades de protozoos en entornos relacionados con la alimentación necesita una mayor exploración. Por ello, adicionalmente y con el fin de entender en mayor profundidad el microbioma de las amebas de vida libre, el presente proyecto continúa llevándose a cabo también a partir de muestras de alimentos convencionales (no orgánicos). El objetivo es realizar un análisis comparativo que permita establecer si hay diferencias significativas entre ambos tipos de muestras y confirmar si realmente existe un riesgo microbiológico asociado únicamente a muestras procedentes de vegetales orgánicos. Asimismo, se está estudiando paralelamente la presencia de FLA, así como el microbioma de estas amebas, presentes en aguas residuales que pueden emplearse como agua de riego de cultivos vegetales.

## 6. Bibliografía

- ALEGBELEYE, O. O.; SINGLETON, I. & SANT'ANA, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 73, 177-208.
- AMORÓS, I.; ALONSO, J. L. & CUESTA, G. (2010). Cryptosporidium Oocysts and Giardia Cysts on Salad Products Irrigated with Contaminated Water. *Journal of Food Protection*, 73(6), 1138-1140.
- BARKER, J. & BROWN, M. R. W. (1994). Trojan Horses of the microbial world: Protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 140(6), 1253-1259.
- BARKER, J.; HUMPHREY, T. J. & BROWN, M. W. R. (1999). Survival of *Escherichia coli* 0157 in a soil protozoan: Implications for disease. *FEMS Microbiology Letters*, 173(2), 291-295.
- BIOTIUM. (2019). Product information. PMA (Propidium Monoazide).
- BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A.; ABNET, C. C.; AL-GHALITH, G. A.; ALEXANDER, H.; ALM, E. J.; ARUMUGAM, M.; ASNICAR, F.; BAI, Y.; BISANZ, J. E.; BITTINGER, K.; BREJNROD, A.; BRISLAWN, C. J.; BROWN, C. T.; CALLAHAN, B. J.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; CHASE, J., ... CAPORASO, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857.
- BRIELAND, J. K.; FANTONE, J. C.; REMICK, D. G.; LEGENDRE, M.; MCCLAIN, M. & ENGLEBERG, N. C. (1997). The role of Legionella pneumophila-infected Hartmannella vermiformis as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infection and Immunity*, 65(12), 5330-5333.
- BUI, X.; QVORTRUP, K.; WOLFF, A.; BANG, D. & CREUZENET, C. (2012). Effect of environmental stress factors on the uptake and survival of Campylobacter jejuni in Acanthamoeba castellanii. *BMC Microbiology*, 12(1), 232.
- BUSE, H. Y. & ASHBOLT, N. J. (2011). Differential growth of Legionella pneumophila strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing: Host and temperature effects on Leg. pneumophila replication. *Letters in Applied Microbiology*, 53(2), 217-224.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A. & HOLMES, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583.
- CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N., PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K. & MADDEN, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421.

- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; ... KNIGHT, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.
- CARINI, P.; MARSDEN, P. J.; LEFF, J. W.; MORGAN, E. E.; STRICKLAND, M. S. & FIERER, N. (2017). Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature Microbiology*, 2(3), 16242.
- CENTERS OF DISEASE AND CONTROL. (2019). Free Living Amebic Infections. Visto el 8 de Junio de 2021. <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.htm>
- CENTROS PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES. (2021). Visto el 8 de Junio de 2021. <https://www.cdc.gov/spanish/index.html>
- CHAVATTE, N.; LAMBRECHT, E.; VAN DAMME, I.; SABBE, K. & HOUF, K. (2016). Abundance, diversity and community composition of free-living protozoa on vegetable sprouts. *Food Microbiology*, 55, 55-63.
- CHRISTENSEN, H. (Ed.). (2018). *Introduction to bioinformatics in microbiology*. (p. 213). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- CIRILLO, J. D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. & BERMUDEZ, L. E. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection and Immunity*, 65(9), 3759-3767.
- COMISIÓN ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN. (2021). Niveles de bioseguridad en laboratorios. Visto el 5 de Junio de 2021. <https://www.um.es/web/comision-etica-investigacion/experimentacion/niveles-de-bioseguridad>
- COMISIÓN EUROPEA. (2021). Productos vegetales. *Normas, información sobre el sector y estadísticas sobre productos específicos de origen vegetal*. Visto el 12 de Abril de 2021. [https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products\\_es](https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products_es)
- DELAFONT, V.; BROUKE, A.; BOUCHON, D.; MOULIN, L. & HÉCHARD, Y. (2013). Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Research*, 47(19), 6958-6965.
- DOYSCHER, D.; FIESELER, L.; DONS, L.; LOESSNER, M. J. & SCHUPPLER, M. (2013). *Acanthamoeba* feature a unique backpacking strategy to trap and feed on *Listeria monocytogenes* and other motile bacteria: Interaction of *Listeria monocytogenes* with *Acanthamoeba*. *Environmental Microbiology*, 15(2), 433-446.
- DUCHAUD, E.; BOUSSAHA, M.; LOUX, V.; BERNARDET, J.-F.; MICHEL, C.; KEROUAULT, B.; MONDOT, S.; NICOLAS, P.; BOSSY, R.; CARON, C.; BESSIÈRES, P.; GIBRAT, J.-

- F.; CLAVEROL, S.; DUMETZ, F.; HÉNAFF, M. L. & BENMANSOUR, A. (2007). Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnology*, 25(7), 763-769.
- ECOLOGICAL. (2018). Estadísticas Agricultura Ecológica. *Informes y datos sobre la agricultura ecológica*. Visto el 12 de Abril de 2021. <https://www.ecological.bio/es/category/estadisticas-agricultura-ecologica/>
- EMERSON, J. B.; ADAMS, R. I.; ROMÁN, C. M. B.; BROOKS, B.; COIL, D. A.; DAHLHAUSEN, K.; GANZ, H. H.; HARTMANN, E. M.; HSU, T.; JUSTICE, N. B.; PAULINO-LIMA, I. G.; LUONGO, J. C.; LYMPEROPOULOU, D. S.; GOMEZ-SILVAN, C.; ROTHCHILD-MANCINELLI, B.; BALK, M.; HUTTENHOWER, C.; NOCKER, A.; VAISHAMPAYAN, P. & ROTHCHILD, L. J. (2017). Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome*, 5(1), 86.
- ESTEBAN, G. F.; FINLAY, B. J. & WARREN, A. (2015). Free-Living Protozoa. En *Thorpe and Covich's Freshwater Invertebrates* (pp. 113-132). Elsevier.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. (2020). Strategy 2020. Protecting consumers' health with independent scientific advice on the food chain.
- EUROPEAN PARLIAMENT (2016). Human health implications of organic food and organic agriculture.
- FERNANDEZ-LEBORANS, G. (2010). Epibiosis in Crustacea: an overview. *Crustaceana*, 549-640.
- FUKUDA, K.; OGAWA, M.; TANIGUCHI, H. & SAITO, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223-232.
- GILBERT, J. A.; JANSSON, J. K. & KNIGHT, R. (2014). The Earth Microbiome project: Successes and aspirations. *BMC Biology*, 12(1), 69.
- GOURABATHINI, P.; BRANDL, M. T.; REDDING, K. S.; GUNDERSON, J. H. & BERK, S. G. (2008). Interactions between Food-Borne Pathogens and Protozoa Isolated from Lettuce and Spinach. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2518-2525.
- GREUB, G. & RAOULT, D. (2004). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 413-433.
- HAJIALILO, E.; NIYYATI, M. & SOLAYMANI, M. (2015). Pathogenic Free-Living Amoebae Isolated From Contact Lenses of Keratitis Patients. *Iran J Parasitol*, 10(4), 6.
- HUGHNER, R. S.; MCDONAGH, P.; PROTHERO, A.; SHULTZ, C. J. & STANTON, J. (2007). Who are organic food consumers? A compilation and review of why people purchase organic food. *Journal of Consumer Behaviour*, 6(2-3), 94-110.

- JEON, K. W. & LORCH, I. J. (1967). Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free-living amoebae. *Experimental cell research*, 48(1), 236-240.
- JIA, X.; HU, L.; WU, M.; LING, Y.; WANG, W.; LU, H.; YUAN, Z.; YI, Z. & ZHANG, X. (2021). A streamlined clinical metagenomic sequencing protocol for rapid pathogen identification. *Scientific Reports*, 11(1), 4405.
- KIM, J., LIM, J. & LEE, C. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1358-1373.
- KIMURA, N. (2006). Metagenomics: Access to Unculturable Microbes in the Environment. *Microbes and Environments*, 21(4), 201-215.
- KUIPER, M. W.; VALSTER, R. M.; WULLINGS, B. A.; BOONSTRA, H., SMIDT, H. & VAN DER KOOIJ, D. (2006). Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5750-5756.
- LALONDE, L. F. & GAJADHAR, A. A. (2016). Optimization and validation of methods for isolation and real-time PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits. *Food and Waterborne Parasitology*, 2, 1-7.
- LYNCH, M. F., TAUXE, R. V. & HEDBERG, C. W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137(3), 307-315.
- MIE, A.; ANDERSEN, H. R.; GUNNARSSON, S.; KAHL, J.; KESSE-GUYOT, E.; REMBIAŁKOWSKA, E.; QUAGLIO, G. & GRANDJEAN, P. (2017). Human health implications of organic food and organic agriculture: A comprehensive review. *Environmental Health*, 16(1), 111.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2020). Análisis de la caracterización y proyección de la producción ecológica en España en 2019.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2018). Estrategia para la Producción Ecológica 2018-2020.
- MORENO, Y.; MORENO-MESONERO, L. & GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. (2019). DVC-FISH to identify potentially pathogenic *Legionella* inside free-living amoebae from water sources. *Environmental research*, 176, 108521.
- MORENO-MESONERO, L. (2018). *Estudio del papel de las amebas de vida libre como reservorio de Helicobacter pylori y otras bacterias patógenas en aguas y alimentos mediante técnicas moleculares* [Universitat Politècnica de València].

- MORENO-MESONERO, L.; FERRÚS, M. A. & MORENO, Y. (2020). Determination of the bacterial microbiome of free-living amoebae isolated from wastewater by 16S rRNA amplicon-based sequencing. *Environmental Research*, 190, 109987.
- MORENO-MESONERO, L.; HORTELANO, I.; MORENO, Y. & FERRÚS, M. A. (2020). Evidence of viable *Helicobacter pylori* and other bacteria of public health interest associated with free-living amoebae in lettuce samples by next generation sequencing and other molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108477.
- MORENO-MESONERO, L.; MORENO, Y.; ALONSO, J. L. & FERRÚS, M. A. (2016). DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Research in Microbiology*, 167(1), 29-34.
- MORENO-MESONERO, L., MORENO, Y., ALONSO, J. L., & FERRÚS, M. A. (2017). Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain: Detection of viable *H. pylori* inside aquatic FLA. *Environmental Microbiology*, 19(10), 4103-4112.
- NAPOLITANO, J. J. & COLLETTI-EGGOLT, C. (1984). Occurrence of Amoebae on Oak Leaf Lettuce ( *Lactuca sativa* var. *Crispa* ) and Boston Lettuce ( *L. sativa* var. *Capitata* )1. *The Journal of Protozoology*, 31(3), 454-455.
- PAGE, F. C. (1988). *A new key to freshwater and soil gymnamoebae with instructions for culture*. Ed. Ambleside, Cumbria, UK: Freshwater Biological Association.
- PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K.; LEONG, F. T.; DOUGLAS, S. H.; FIELD, S. L.; BELL, S. M.; COMBARET, V.; PUISIEUX, A.; MIGHELL, A. J.; ROBINSON, P. A.; INGLEHEARN, C. F.; ISAACS, J. D. & MARKHAM, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3(1), 1-13.
- QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G. S.; SRIRAM, R. & DA SILVA, A. J. (2006). Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* , and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3589-3595.
- RATNER, H. (1984). Topics in Clinical Microbiology *Flavobacterium Meningosepticum*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 5(5), 237-241.
- ROWBOTHAM, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, 33(12), 1179-1183.
- SAMBA-LOUAKA, A.; DELAFONT, V.; RODIER, M.-H.; CATEAU, E. & HÉCHARD, Y. (2019). Free-living amoebae and squatters in the wild: Ecological and molecular features. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(4), 415-434.

- SHARPTON, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*, 5, 209.
- SIDDIQUI, R.; ABOULEISH, M. Y.; KHAMIS, M.; IBRAHIM, T. & KHAN, N. A. (2021). Dual Targeting of Function–Structure for Effective Killing of Pathogenic Free-Living Amoebae. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12(5), 672-676.
- SIDDIQUI, R.; & KHAN, N. A. (2012). War of the microbial worlds: Who is the beneficiary in Acanthamoeba–bacterial interactions? *Experimental Parasitology*, 130(4), 311-313.
- SIM, S.; WON, J.; KIM, J.-W.; KIM, K.; PARK, W.-Y. & YU, J.-R. (2017). Simultaneous Molecular Detection of Cryptosporidium and Cyclospora from Raw Vegetables in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 55(2), 137-142.
- TAKAHASHI, S.; TOMITA, J.; NISHIOKA, K.; HISADA, T. & NISHIJIMA, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS one*, 9(8), e105592.
- VAEREWIJCK, M. J. M.; BARÉ, J.; LAMBRECHT, E.; SABBE, K. & HOUF, K. (2014). Interactions of Foodborne Pathogens with Free-living Protozoa: Potential Consequences for Food Safety: Interactions of foodborne pathogens with FLP.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 924-944.
- VAEREWIJCK, M. J. M.; SABBE, K.; BARÉ, J. & HOUF, K. (2008). Microscopic and Molecular Studies of the Diversity of Free-Living Protozoa in Meat-Cutting Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5741-5749.
- VAEREWIJCK, M. J. M.; SABBE, K.; BARÉ, J. & HOUF, K. (2011). Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 105-111.
- VAEREWIJCK, M. J. M.; SABBE, K.; VAN HENDE, J.; BARÉ, J. & HOUF, K. (2010). Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators: Free-living protozoa in refrigerators. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1566-1578.
- VALENZUELA, C.; GIL, M., URRUTIA, Í. M.; SABAG, A.; ENNINGA, J. & SANTIVIAGO, C. A. (2021). SopB- and SifA-dependent shaping of the *Salmonella* -containing vacuole proteome in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Cellular Microbiology*, 23(1).



## 7. Anexos

### Anexo 1: Medio de cultivo sólido

#### Non-nutrient agar PAGE (NNAP)

El Agar Bacteriológico Europeo se disuelve en PAGE 1X previamente preparado, obteniendo una composición final de 15 g/L. La disolución se esteriliza en el autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 15 minutos. Se vierte en una placa y se deja enfriar hasta su solidificación.

### Anexo 2: Reactivos empleados en tratamiento de Cloro y PMA

#### Extracción de DNA

GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, referencia K0722) concretamente, se siguió el protocolo de purificación de DNA genómico de células cultivadas de mamífero.

#### Hipoclorito de sodio

Se realiza una dilución de hipoclorito de sodio (100 ppm) con PAGE 1X hasta obtener una concentración de hipoclorito sódico de 1630 ppm.

#### Solución salina amébica de Page (PAGE 10X)

Se disuelven los siguientes componentes en agua destilada obteniendo una composición final (g/l):

Cloruro de sodio (NaCl)	1.20
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	0.04
Hidrogenofosfato de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.42
Dihidrogenofosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.36
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0.04

#### PAGE 1X

Se realiza una dilución 1:10 de PAGE 10X con agua destilada.

#### PBS 1X estéril

Se filtra PBS 1X sin calcio y magnesio Lot 23016003. Ref:21-040- CVR (Corning, Mediatech) empleando un filtro Fisherbrand.

#### PMA

Para crear una concentración de 20 mM en stock de PMA, 1 mg sólido de este se disuelve en 98 µl de agua Milli-Q.

### Anexo 3: *Pipeline* de QIIME2

#### #Importar secuencias

```
qiime tools import \
  --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \
  --input-path FLA-Manifest-file.tsv \
  --output-path fastq.qza \
  --input-format PairedEndFastqManifestPhred33V2
```

#### #Resumen de los resultados

```
qiime demux summarize \
  --i-data fastq.qza \
  --o-visualization fastq.qzv
```

#### #Dada2: unir las secuencias, eliminar el ruido y filtrar las quimeras

```
qiime dada2 denoise-paired \
  --p-trim-left-f 10 \
  --p-trim-left-r 10 \
  --p-trunc-len-f 290 \
  --p-trunc-len-r 220 \
  --o-table table.qza \
  --o-representative-sequences rep-seqs.qza \
  --o-denoising-stats denoising-stats.qza
```

#### #Resumen de los resultados

```
qiime feature-table summarize \
  --i-table table.qza \
  --o-visualization table.qzv \
  --m-sample-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv

qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data rep-seqs.qza \
  --o-visualization rep-seqs.qzv

qiime metadata tabulate \
  --m-input-file denoising-stats.qza \
  --o-visualization denoising-stats.qzv \
```

#### #Asignar taxonomía a las ASVs

```
qiime feature-classifier classify-consensus-blast \
```

```
--i-query rep-seqs.qza \
--i-reference-reads silva-138-99-seqs.qza \
--i-reference-taxonomy silva-138-99-tax.qza \
--o-classification taxonomy.qza \
--p-perc-identity 0.97
```

### **#Crear visualización de la taxonomía**

```
qiime metadata tabulate \
--m-input-file taxonomy.qza \
--o-visualization taxonomy.qzv
```

### **#Filtrar secuencias de mitocondrias y cloroplastos**

```
qiime taxa filter-table \
--i-table table.qza \
--i-taxonomy taxonomy.qza \
--p-exclude mitochondria;chloroplast \
--o-filtered-table filtered-table.qza
```

### **#Crear barplot de la composición taxonómica de las muestras**

```
qiime taxa barplot \
--i-table filtered-table.qza \
--i-taxonomy taxonomy.qza \
--o-visualization taxa-barplots.qzv \
--m-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv
```

### **#Generar árbol filogenético requerido para pasos posteriores**

```
qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree \
--i-sequences rep-seqs.qza \
--o-alignment aligned-rep-seqs.qza \
--o-masked-alignment masked-alignment-rep-seqs.qza \
--o-tree unrooted-tree.qza \
--o-rooted-tree rooted-tree.qza
```

### **#Normalizar**

```
qiime diversity alpha-rarefaction \
--i-table filtered-table.qza \
--i-phylogeny rooted-tree.qza \
--p-max-depth 41700 \
```

```
--o-visualization alpha-rarefaction.qzv \
--m-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv \
--p-metrics 'observed-features' \
```

### **#Parámetros de diversidad**

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic \
--i-phylogeny rooted-tree.qza \
--i-table filtered-table.qza \
--p-sampling-depth 41700 \
--m-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv \
--output-dir core-metrics-results
```

### **#Diversidad alfa**

```
qiime diversity alpha-group-significance \
--i-alpha-diversity core-metrics-results/faith_pd_vector.qza \
--m-metadata-file FLA-Metadata.tsv \
--o-visualization core-metrics-results/faith-pd-group-significance.qzv
```

### **#Diversidad beta**

```
qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core-metrics-results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file FLA-Metadata.tsv \
--m-metadata-column alimento\
--o-visualization core-metrics-results/unweighted-unifrac-alimento-significance.qzv \
--p-pairwise
```

### **#Crear PCA**

```
qiime emperor plot \
--i-pcoa core-metrics-results/unweighted-unifrac-pcoa-results.qza \
--m-sample-metadata-file FLA-Metadata-file.tsv \
--o-visualization core-metrics-results/unweighted-unifrac-pcoa-results.qzv \
```

### **#Obtener *core microbiome***

```
qiime feature-table core-features \
--i-table table.qza \
--p-min-fraction 0.5 \
--p-max-fraction 1 \
--o-visualization core-microbiome.qzv
```

## Anexo 4: Tabla suplementaria del análisis bioinformático

**Tabla 13.** Abundancia relativa de bacterias de interés para la Salud Pública presentes en las muestras de vegetales orgánicos.

Género	Promedio	Muestras de espinaca	Muestras de lechuga
<i>Achromobacter</i>	1.6529%	1.1723%	1.9892%
<i>Acidovorax</i>	0.9021%	1.0014%	0.8326%
<i>Acinetobacter</i>	0.6990%	0.4267%	0.8896%
<i>Aeromonas</i>	0.0561%	0.1154%	0.0146%
<i>Arcobacter</i>	0.0004%	0.0000%	0.0007%
<i>Bacillus</i>	0.2467%	0.0573%	0.3792%
<i>Bacteroides</i>	0.0002%	0.0004%	0.0000%
<i>Bordetella</i>	0.0292%	0.0269%	0.0308%
<i>Brevibacillus</i>	0.0023%	0.0057%	0.0000%
<i>Brevundimonas</i>	0.7024%	0.6540%	0.7363%
<i>Capnocytophaga</i>	0.0004%	0.0011%	0.0000%
<i>Chryseobacterium</i>	0.2496%	0.0588%	0.3833%
<i>Citrobacter</i>	0.0712%	0.0175%	0.1089%
<i>Clostridium</i>	0.0013%	0.0015%	0.0012%
<i>Comamonas</i>	0.4373%	0.3607%	0.4908%
<i>Corynebacterium</i>	0.0051%	0.0000%	0.0086%
<i>Coxiella</i>	0.0006%	0.0014%	0.0000%
<i>Delftia</i>	1.8534%	1.1294%	2.3602%
<i>Enterobacter</i>	0.2720%	0.0741%	0.4105%
<i>Erwinia</i>	0.0273%	0.0000%	0.0464%
<i>Erysipelothrix</i>	0.0058%	0.0012%	0.0090%
<i>Flavobacterium</i>	10.6491%	14.6797%	7.8276%
<i>Fusobacterium</i>	0.0213%	0.0179%	0.0237%
<i>Granulicatella</i>	0.0025%	0.0061%	0.0000%
<i>Klebsiella</i>	0.0026%	0.0064%	0.0000%
<i>Kocuria</i>	0.0026%	0.0018%	0.0032%
<i>Legionella</i>	0.5006%	0.1630%	0.7368%
<i>Leuconostoc</i>	0.0004%	0.0009%	0.0000%
<i>Mycobacterium</i>	0.0422%	0.0271%	0.0527%

<i>Nocardia</i>	0.0024%	0.0000%	0.0041%
<i>Ochrobactrum</i>	0.0564%	0.1160%	0.0147%
<i>Paenibacillus</i>	0.7548%	1.1828%	0.4553%
<i>Pantoea</i>	0.0909%	0.0233%	0.1382%
<i>Paracoccus</i>	0.0318%	0.0363%	0.0287%
<i>Peptococcus</i>	0.0460%	0.0000%	0.0782%
<i>Providencia</i>	0.0191%	0.0000%	0.0325%
<i>Pseudomonas</i>	9.5694%	1.1838%	15.4394%
<i>Rahnella</i>	0.0003%	0.0000%	0.0004%
<i>Ralstonia</i>	0.0020%	0.0000%	0.0035%
<i>Rhodococcus</i>	0.0020%	0.0000%	0.0035%
<i>Rickettsia</i>	0.1104%	0.0961%	0.1205%
<i>Salmonella</i>	0.0031%	0.0000%	0.0052%
<i>Serratia</i>	0.0007%	0.0018%	0.0000%
<i>Shewanella</i>	0.0005%	0.0000%	0.0008%
<i>Sphingobacterium</i>	0.2624%	0.3316%	0.2140%
<i>Sphingomonas</i>	0.7012%	0.4414%	0.8830%
<i>Staphylococcus</i>	0.0873%	0.0332%	0.1252%
<i>Stenotrophomonas</i>	4.4376%	1.1950%	6.7075%
<i>Streptococcus</i>	0.0028%	0.0061%	0.0004%
<i>Streptomyces</i>	0.0185%	0.0225%	0.0157%
<i>Tissierella</i>	0.0074%	0.0000%	0.0126%
<i>Xanthomonas</i>	0.0292%	0.0000%	0.0497%
Total	34.7006%	24.7141%	41.6912%